

**Université Louis Pasteur, Strasbourg I**

**THESE**

Présentée à  
LA FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR  
Domaine: BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Par  
**Benoît MENAND**

Etude par génétique inverse du gène codant la protéine TARGET OF  
RAPAMYCIN d'*Arabidopsis thaliana* (AtTOR), l'homologue d'une kinase  
contrôlant la croissance cellulaire chez les eucaryotes

le 25 mars 2002 devant la commission d'examen :

**Dr. Jean-Denis FAURE**

**Dr. Pascal GENSCHIK**

**Pr. Michael HALL**

**Pr. Christophe ROBAGLIA**

**Pr. Jacques-Henry WEIL**

**Rapporteur externe**

**Rapporteur interne**

**Rapporteur externe**

**Directeur de thèse**

**Co-directeur de thèse**

Laboratoire du Métabolisme Carboné, CEA de Cadarache, St Paul lez Durance

## Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sous la direction de Christophe Robaglia. J'ai beaucoup apprécié sa manière d'encadrer ma thèse : il m'a laissé une grande liberté d'action tout en étant toujours présent pour une discussion.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, Jean-Denis Faure (INRA, Versailles), Pascal Genshick (IBMP, Strasbourg), Michael Hall (Université de Bâle) et Jacques-Henry Weil (IBMP, Strasbourg), qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Le projet sur l'étude de la voie de TOR d'*Arabidopsis* a été initié avec Christian Meyer (INRA, Versailles) que je remercie de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse.

Je remercie aussi Frédéric Berger (ENS/INRA, Lyon), Fabienne Granier et David Bouchez (INRA, Versailles) qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires afin de m'initier à la microscopie confocale et de me permettre de cribler la collection de mutants de l'INRA de Versailles.

Je remercie également Marie-Christine Thibaud, Thierry Desnos, Laurent Nussaume et mon père Jean-Pierre Menand pour le temps qu'ils ont passé à la relecture de ce manuscrit.

Je tiens aussi à remercier l'équipe du LMC, Anne, Audrey, Boris, Catherine, Claire, Christophe, Jérôme, Julie, Laurent, Marie-Christine, Maryse, Pascale et Thierry pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens enfin à remercier les membres de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg, notamment Henri Wintz, qui ont initié ma formation à la recherche au cours de mon DEA.

Ce travail a été réalisé grâce à une bourse co-financée par l'Institut National de la Recherche Agronomique et le Commissariat à l'Energie Atomique.

Contact : [ben\\_menand@hotmail.com](mailto:ben_menand@hotmail.com)

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1 Contrôle de la croissance cellulaire</b>	<b>1</b>
1.1 Contrôle de la croissance des bactéries	1
1.2 Coordination entre la croissance et la division cellulaire chez les levures	2
1.3 Croissance cellulaire chez les plantes	3
1.3.1 Particularités des plantes au regard de la croissance	3
1.3.2 La plante modèle <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
1.3.3 Croissance associée à la prolifération au niveau des méristèmes primaires	4
1.3.4 Croissance associée à la différenciation	5
1.3.5 Croissance cellulaire polarisée	6
1.3.6 Cas particulier de l'albumen	6
1.4 Coordination entre la croissance cellulaire et la division cellulaire chez les plantes	6
1.5 Contrôle de la croissance des plantes	7
1.5.1 Contrôle de la croissance des plantes par les hormones	7
1.5.2 État nutritif et croissance	8
1.6 La croissance cellulaire chez les animaux	9
<b>2 La voie de signalisation de TOR</b>	<b>10</b>
2.1 La découverte de la rapamycine et de ses cibles	10
2.1.1 La rapamycine	10
2.1.2 Découverte des protéines TOR	11
2.1.3 Caractéristiques moléculaires des protéines TOR	11
2.2 La voie de TOR chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.2.1 Contrôle de la biosynthèse des ribosomes et de la traduction	14
2.2.2 Une phosphatase dans la voie de signalisation de TOR	15
2.2.3 Contrôle de l'autophagie et du transport membranaire	16
2.2.4 Contrôle des gènes de réponse aux carences et aux stress	17
2.2.5 Contrôle de processus de différenciation	18
2.2.6 Contrôle de l'organisation du cytosquelette	18
2.3 La voie de TOR de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19
2.4 La voie de TOR de mammifères	20
2.4.1 Régulation de la synthèse protéique globale	20
2.4.2 Régulation de la transcription	21
2.4.3 Contrôle de l'initiation de la traduction	22
2.4.4 Implication d'une protéine phosphatase dans la voie de signalisation de mTOR	23
2.4.5 Contrôle du cycle cellulaire	23
2.4.6 Activation de mTOR par l'insuline et les facteurs de croissance	24
2.4.7 Stimulation de mTOR par les aminoacides	26
2.4.8 Autres modes de contrôle de mTOR	28
2.4.9 Confirmations in vivo de l'importance de la voie de mTOR	28
2.5 Analyse génétique de la voie de TOR de drosophile	29
2.6 Conservation de la voie de TOR chez les levures et les animaux	31
2.7 Potentialité d'une voie de TOR chez les plantes	32

## RESULTATS

35

### 1 Rapamycine et croissance des plantes

35

1.1 Sensibilité d' <i>Arabidopsis</i> à la rapamycine	35
---	----

1.2	Sensibilité d'autres plantes à la rapamycine	35
1.3	Inhibition de la croissance d' <i>Arabidopsis</i> par <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	36
<b>2</b>	<b>Caractérisation du gène <i>TOR</i> d'<i>Arabidopsis</i></b>	
36	2.1 Identification d'un gène <i>TOR</i> dans le génome d' <i>Arabidopsis</i>	
36		
2.2	Clonage de l'ADN complémentaire de AtTOR	37
2.3	Structure du gène AtTOR	38
2.4	La protéine AtTOR	38
2.5	Présence de gènes <i>TOR</i> chez d'autres plantes	40
<b>3</b>	<b>Analyse par génétique inverse de la fonction de AtTOR et de son profil d'expression</b>	
40		
3.1	Identification de mutants d'insertion d'ADN-T dans le gène AtTOR	41
3.1.1	Isolement d'un mutant de AtTOR avec un crible par PCR	41
3.1.2	Analyse de l'insertion de l'ADN-T dans le mutant <i>tor-2</i>	42
3.1.3	Obtention d'un second mutant de AtTOR	43
3.2	Article 1 : Expression and disruption of the <i>Arabidopsis TOR</i> (Target of Rapamycin) gene	44
3.3	Données complémentaires à l'article 1	62
3.3.1	Phénotype du mutant <i>tor-2</i>	62
3.3.2	Absence de phénotype chez les mutants <i>tor-1</i> et <i>tor-2</i> hétérozygotes	62
3.3.3	Profil d'expression de AtTOR après traitements par des phytohormones	62
3.3.4	Suivi de l'ARNm de AtTOR	63
<b>4</b>	<b>Etude des interactions potentielles entre AtTOR, la rapamycine et les FKBP d'<i>Arabidopsis</i></b>	
64		
4.1	AtTOR ne se fixe pas à AtFKBP12 en présence de rapamycine	64
4.2	Analyse des autres FKBP d' <i>Arabidopsis</i>	65
4.3	Transformation d' <i>Arabidopsis</i> avec le gène codant le FKBP12 de <i>S. cerevisiae</i>	66
4.3.1	Utilisation du promoteur de AtTOR	66
4.3.2	Utilisation du promoteur 35S	66
<b>5</b>	<b>Initiation d'un projet de sur-expression de AtTOR</b>	
67		
5.1	Expression de AtTOR sous le contrôle du promoteur 35S	67
5.2	Le système UAS-GAL4 pour induire la sur-expression de AtTOR	67

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

68

## MATERIEL ET METHODES

71

### 1 Matériel

71

1.1	Souches bactériennes	71
1.2	Souche de levure	71
1.3	<i>Chlamydomonas</i>	71
1.4	Plantes	71
1.4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	71
1.4.2	Autres plantes	72
1.4.3	Culture cellulaire d' <i>Arabidopsis</i>	72
1.5	Plasmides	72

### 2 Conditions de culture et transformations génétiques

72

2.1	Conditions de culture et transformation des bactéries	72
2.1.1	Conditions de culture des bactéries	72

2.1.2	<i>Transformation des bactéries</i>	72
<b>2.2</b>	<b>Condition de culture et transformation des levures</b>	<b>73</b>
2.2.1	<i>Conditions de culture des levures</i>	73
2.2.2	<i>Transformation génétique des levures</i>	73
<b>2.3</b>	<b>Conditions de culture de Chlamydomonas</b>	<b>73</b>
<b>2.4</b>	<b>Conditions de culture des plantes et transformation génétique</b>	<b>73</b>
2.4.1	<i>Conditions de culture d'Arabidopsis thaliana</i>	73
2.4.2	<i>Conditions de culture des autres plantes</i>	74
2.4.3	<i>Transformation génétique d'Arabidopsis par Agrobacterium tumefaciens</i>	74
<b>2.5</b>	<b>Phytohormones et rapamycine</b>	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>Biologie moléculaire</b>	
<b>75</b>		
<b>3.1</b>	<b>Réactions d'amplification en chaîne (PCR) et séquençage</b>	<b>75</b>
<b>3.2</b>	<b>Clonages moléculaires</b>	<b>75</b>
<b>3.3</b>	<b>5' RACE</b>	<b>77</b>
<b>3.4</b>	<b>Double hybride</b>	<b>77</b>
<b>3.5</b>	<b>Extractions d'acides nucléiques de plantes</b>	<b>77</b>
3.5.1	<i>Extraction d'ADN à partir d'inflorescences d'Arabidopsis</i>	77
3.5.2	<i>Extraction d'ARN totaux d'Arabidopsis</i>	77
3.5.3	<i>Extraction d'ARN poly A+ d'Arabidopsis</i>	78
<b>3.6</b>	<b>Transfert de Southern</b>	<b>78</b>
3.6.1	<i>Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose et transfert sur membrane</i>	78
3.6.2	<i>Marquage de sondes et hybridation des membranes</i>	78
3.6.3	<i>Hybridation des produits de PCR lors du criblage des mutants de la collection de Versailles</i>	79
<b>3.7</b>	<b>Transfert de Northern</b>	<b>79</b>
3.7.1	<i>Séparation des ARNs sur gel d'agarose et transfert sur membrane</i>	79
3.7.2	<i>Marquage de la sonde par transcription en présence d'UTP radioactif</i>	79
3.7.3	<i>Hybridation et révélation</i>	79
<b>3.8</b>	<b>RT-PCR semi quantitative</b>	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>Histologie</b>	
<b>80</b>		
<b>5</b>	<b>Bio-informatique</b>	
<b>80</b>		

## REFERENCES

### 82

Abréviations  
97

Résumé  
99

Abstract  
100

# INTRODUCTION

Une différence importante entre les organismes est leur taille. Celle-ci résulte à la fois du nombre et de la taille des cellules qui constituent l'individu. Ainsi, les organismes multicellulaires se développent en combinant les processus de morphogenèse, de croissance cellulaire, de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. La croissance cellulaire est un phénomène, essentiel chez tous les êtres vivants, qui est fondamentalement lié à la prolifération. En effet, la prolifération est souvent couplée à la croissance cellulaire afin de former des cellules filles ayant la même taille que la cellule mère. Dans le premier chapitre, nous présenterons les mécanismes de croissance cellulaire et les façons dont elle est régulée chez les bactéries, les levures, les plantes et les animaux. Dans le chapitre suivant, nous nous concentrerons sur la voie de signalisation de TOR (Target Of Rapamycin), une protéine kinase qui a une place centrale dans le contrôle de la croissance cellulaire en réponse aux facteurs de croissances et aux nutriments chez les levures et les animaux, afin de montrer l'utilité de l'étudier chez les plantes.

## 1 Contrôle de la croissance cellulaire

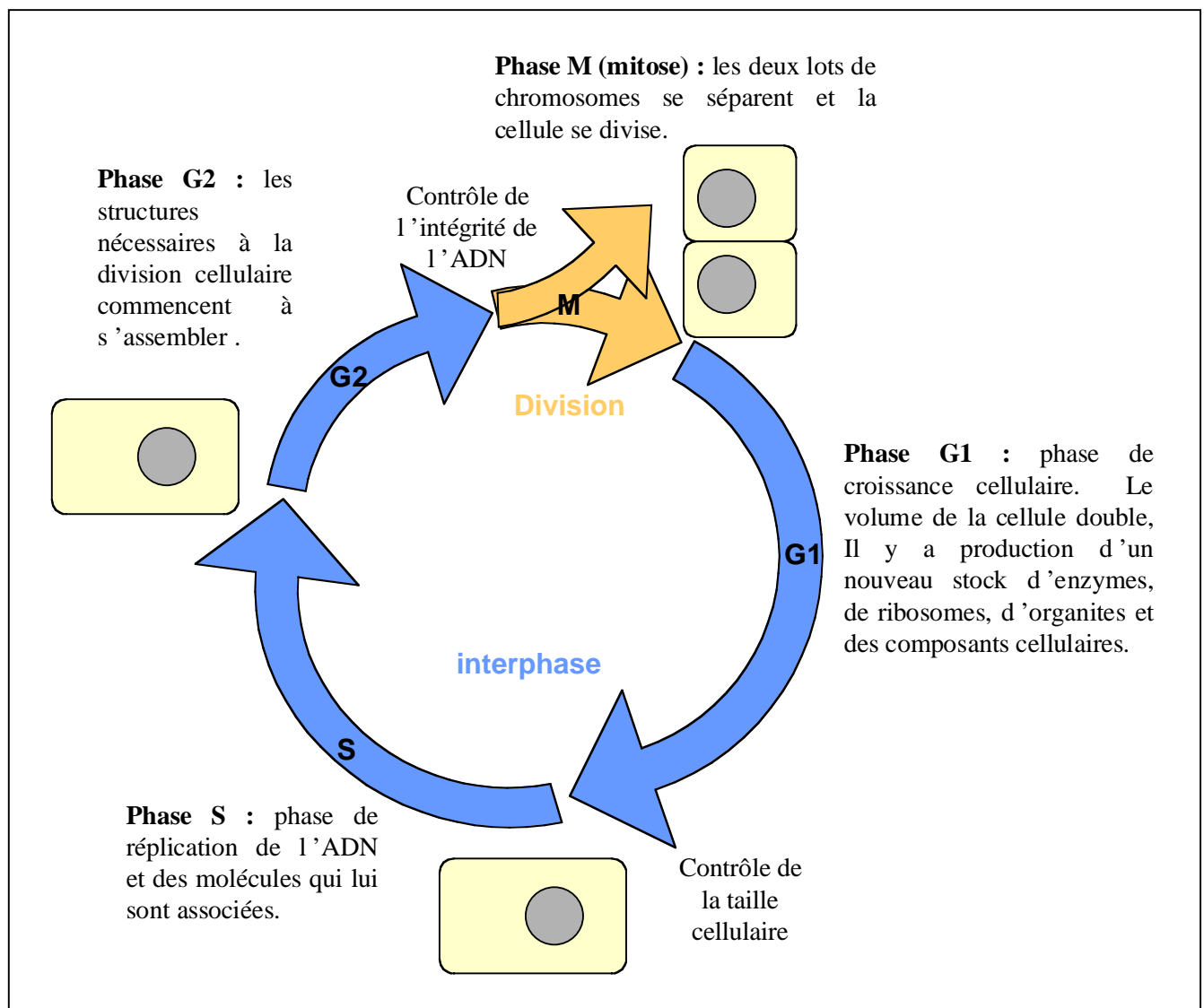
### 1.1 Contrôle de la croissance des bactéries

Chez les procaryotes, les divisions du cytoplasme et de l'ADN sont couplées, les chromosomes fils attachés à la membrane plasmique se séparent l'un de l'autre lors l'extension de celle-ci. Cette prolifération, précédée d'un doublement des composants cellulaires, est rapide en conditions optimales de croissance. Cependant, les bactéries sont souvent soumises à des conditions nutritives limitantes et ont développé des systèmes de perception du statut nutritif qui leur permettent de s'adapter aux carences. Ainsi, les promoteurs des gènes d'ARN ribosomiaux (ARNr) de *Escherichia coli* et *Salmonella* sont particulièrement sensibles à la concentration de nucléotide initiateur de la transcription, en l'occurrence, l'ATP ou le GTP (Gaal *et al.*, 1997). Ces bactéries perçoivent une carence générale par le biais de la diminution de la concentration en purines qui induit une diminution de la synthèse des ARNr et donc de la synthèse protéique globale et de la croissance cellulaire. Chez *Bacillus subtilis*, la réponse à la limitation de nutriments est plus complexe et implique CodY, un répresseur de la transcription des gènes de sporulation, qui n'est activé qu'en présence de fortes concentrations de GTP (Dworkin et Losick, 2001). Ainsi, les purines constituent un élément essentiel de la perception des nutriments par les bactéries.

## 1.2 Coordination entre la croissance et la division cellulaire chez les levures

Deux espèces de levures unicellulaires sont utilisées comme modèle pour l'étude des relations entre croissance et cycle cellulaire chez les eucaryotes : la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* et la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe*. Ces deux levures sont fortement éloignées phylogénétiquement l'une de l'autre et sont plus proches des animaux que des plantes puisqu'elles appartiennent au règne des champignons (Baldauf *et al.*, 2000). Cependant, ces levures sont des organismes particulièrement simples qui ont probablement moins de gènes que les autres champignons, et sont donc peu représentatifs de ce règne (Baldauf, communication personnelle). Néanmoins, leur petit génome et leur mode de vie simple en ont fait des organismes modèles de l'étude des cellules eucaryotes. *S. cerevisiae* prolifère en formant un bourgeon qui est initié en phase G1 (G=Gap, ou intervalles) du cycle cellulaire (qui précède la synthèse d'ADN) et se sépare de la cellule mère après la mitose. Par contre, les levures fissipares sont des cellules en forme de baguette qui grossissent en s'allongeant aux extrémités et se divisent par formation d'une cloison centrale après la mitose.

Les premiers auteurs d'analyses génétiques du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae* ont fait la distinction entre la croissance cellulaire et la division cellulaire et mis en évidence l'importance de la coordination de ces deux phénomènes (Johnston *et al.*, 1977). La division cellulaire correspond à la duplication de l'ADN et du nombre de cellules, alors que la croissance cellulaire représente l'augmentation de masse et de taille liée à la synthèse de macromolécules, principalement les protéines. L'étude génétique du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* a été possible grâce aux mutants conditionnels thermosensibles dans lesquels la protéine mutante est fonctionnelle à une température permissive mais est inactive à une température plus élevée, appelée température restrictive. Ainsi, la conséquence de l'inactivation d'un gène peut être observée en transférant les levures d'une température permissive à une température restrictive. Cela est particulièrement utile pour les mutations liées au cycle cellulaire, qui sont souvent létales. Des mutants thermosensibles arrêtés à différents stades précis de la division cellulaire (mutants *cdc* pour « cell division cycle ») continuent de synthétiser des protéines et de croître alors que des cellules dont la croissance est bloquée arrêtent de se diviser. Cela montre que la croissance est limitante pour la prolifération alors que le contraire n'est pas vrai, et que l'acquisition d'une taille critique est nécessaire pour initier la division (Johnston *et al.*, 1977). Cette étape de contrôle de la taille est appelé point « start », ou « départ », et est située en G1, avant la synthèse d'ADN, chez *S. cerevisiae*. Ce passage de la phase G1 à la phase S, ainsi que le passage des phases G2 à M, lors duquel l'intégrité de l'ADN est vérifiée, constituent les deux points de contrôle (« checkpoints ») du cycle cellulaire, à la fois chez *S. cerevisiae* et chez les animaux (Fig. 1). Il en est autrement chez *S. pombe*, où le contrôle de la croissance cellulaire a



**Figure 1 : modèle du cycle cellulaire eucaryotique.** Les événements présentés sont communs à tous les eucaryotes. Des différences sont observées chez certains organismes, comme *S. pombe* dont la phase de croissance a lieu en G2. G, « Gap » ou intervalle.



lieu en G2, entre la synthèse d'ADN et la mitose (Daga et Jimenez, 1999). C'est pendant cette phase du cycle cellulaire que la cellule semble « prendre la décision », en fonction de la disponibilité en nutriments, de poursuivre le cycle cellulaire ou d'entrer en phase stationnaire.

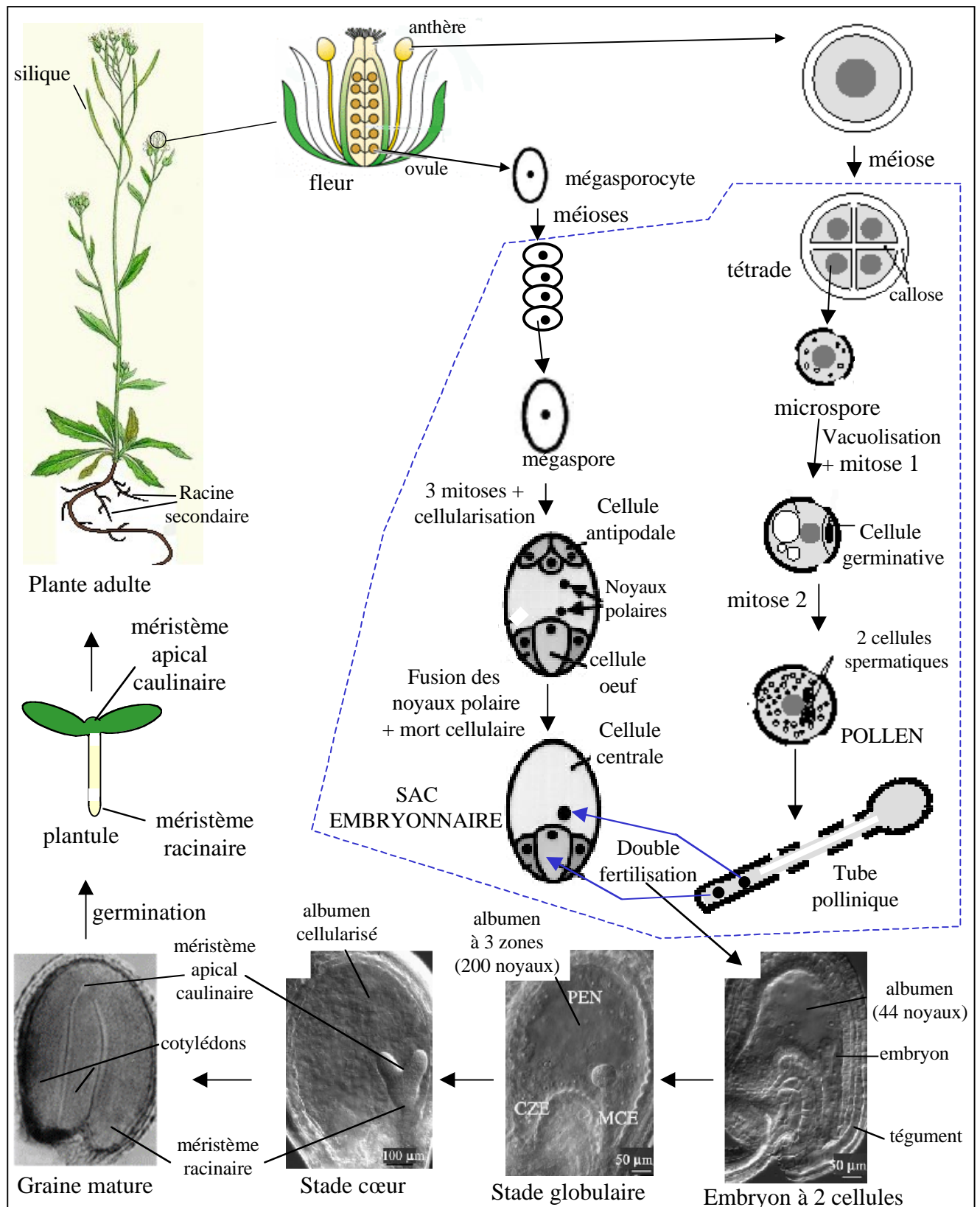
La croissance cellulaire nécessaire au doublement de masse requis pour la division de *S. cerevisiae* met principalement en œuvre une production très élevée de ribosomes. Cela est mis en évidence par le fait que, dans des cellules de levure en forte croissance, 60 % de la transcription totale est consacrée aux ARN ribosomaux (environ 150 gènes d'ARNr) et 50 % de l'activité de l'ARN polymérase II et 90 % de l'épissage des ARNm sont consacrés aux protéines ribosomales (pour revue, Warner, 1999). Le contrôle de la production d'ARNr et de protéines ribosomales en fonction des nutriments a lieu principalement au niveau transcriptionnel. Ainsi, des gènes codant les protéines ribosomales ont des promoteurs possédant des éléments CIS caractéristiques qui pourraient permettre de coordonner leur expression. La régulation de ces ARNm et des ARNr fait notamment intervenir les voies de signalisation de la protéine kinase A, qui répond à l'AMPc, de la protéine kinase C, qui contrôle l'intégrité de la surface cellulaire, et des protéines TOR, qui intègrent les signaux nutritionnels (Warner, 1999).

La cycline CLN3 fait le lien entre la croissance et la progression à travers le cycle cellulaire chez *S. cerevisiae* (Polymenis et Schmidt, 1997). Cette cycline de type G1/S forme un complexe actif avec la kinase CDC28, qui permet d'activer d'autres cyclines et d'entrer en phase S. L'ARNm de *CLN3* est pourvu d'un petit cadre ouvert de lecture situé dans la séquence de tête, en amont de la séquence codant CLN3 (uORF, « upstream open reading frame »). Cette uORF diminue l'efficacité de traduction du transcrit *CLN3* en gênant l'accès du ribosome à l'ORF principale. Il en résulte que la traduction de *CLN3* est particulièrement dépendante de la quantité de ribosomes et donc de la croissance. Ainsi, l'ablation de la uORF accélère la traduction de *CLN3* en conditions normales, ce qui conduit à une réduction du temps passé en phase G1 et, par conséquent, une diminution de la taille des cellules (Polymenis et Schmidt, 1997).

### **1.3 Croissance cellulaire chez les plantes**

#### *1.3.1 Particularités des plantes au regard de la croissance*

Contrairement aux animaux, les plantes ont une croissance indéterminée. C'est-à-dire que les différents organes qui les constituent ne sont pas formés lors de l'embryogenèse, mais tout au long de la vie d'une plante (Fig. 2). Les nouveaux organes sont créés au niveau des méristèmes primaires qui contiennent les cellules souches. Celles-ci sont petites et ont un cytoplasme dense (Fig. 3A et 4A.). Le méristème apical caulinaire est responsable de la formation itérative de tous les organes aériens (feuilles, tige et fleurs) alors que le méristème apical racinaire est à l'origine



**Figure 2 : Cycle de vie d'une angiosperme modèle : *Arabidopsis thaliana*.** La phase haploïde est encadrée en pointillés bleus. La double fécondation produit l'embryon diploïde et l'albumen qui est un syncytium triploïde. Les méristèmes floraux dérivent du méristème apical de la tige. PEN, albumen périphérique ; CZE, chalaze ; MCE. Adapté de : Drews *et al.*, 1998 ; Twell *et al.*, 1998 ; Boissard-Lorig *et al.*, 2001.

du système racinaire (Fig. 3A et 4A). Ces méristèmes sont organisés en domaines multicellulaires (Fig. 3B et 4B). Les méristèmes d'inflorescences sont formés par modification du méristème apical caulinaire lors de la transition florale. Les méristèmes latéraux aériens et racinaires ont une origine différente. En effet, alors que les bourgeons axillaires sont formés à partir du méristème apical caulinaire, les méristèmes des racines latérales ne dérivent pas directement du méristème racinaire primaire, bien qu'ils en aient une structure similaire, mais sont initiés à partir de cellules du péricycle (Fig. 4C). D'autres méristèmes, dits secondaires, ou cambiums, sont responsables de la croissance en épaisseur de la tige et de la racine. Ils sont constitués de cellules qui ont subi une différenciation et présentent des vacuoles bien développées.

D'autre part, les différentes cellules des plantes multicellulaires sont entourées d'une paroi cellulaire rigide. Cependant, les cellules restent reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques appelés plasmodesmes (Zambryski et Crawford, 2000).

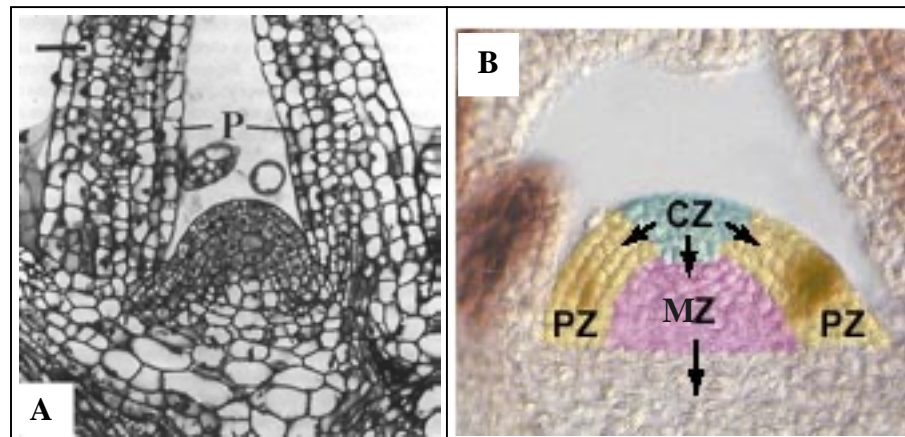
Une autre particularité des plantes vient de leur ancrage au sol. De ce fait, les plantes répondent en permanence aux variations de l'environnement en changeant leur développement et donc leur croissance cellulaire.

### 1.3.2 La plante modèle *Arabidopsis thaliana*

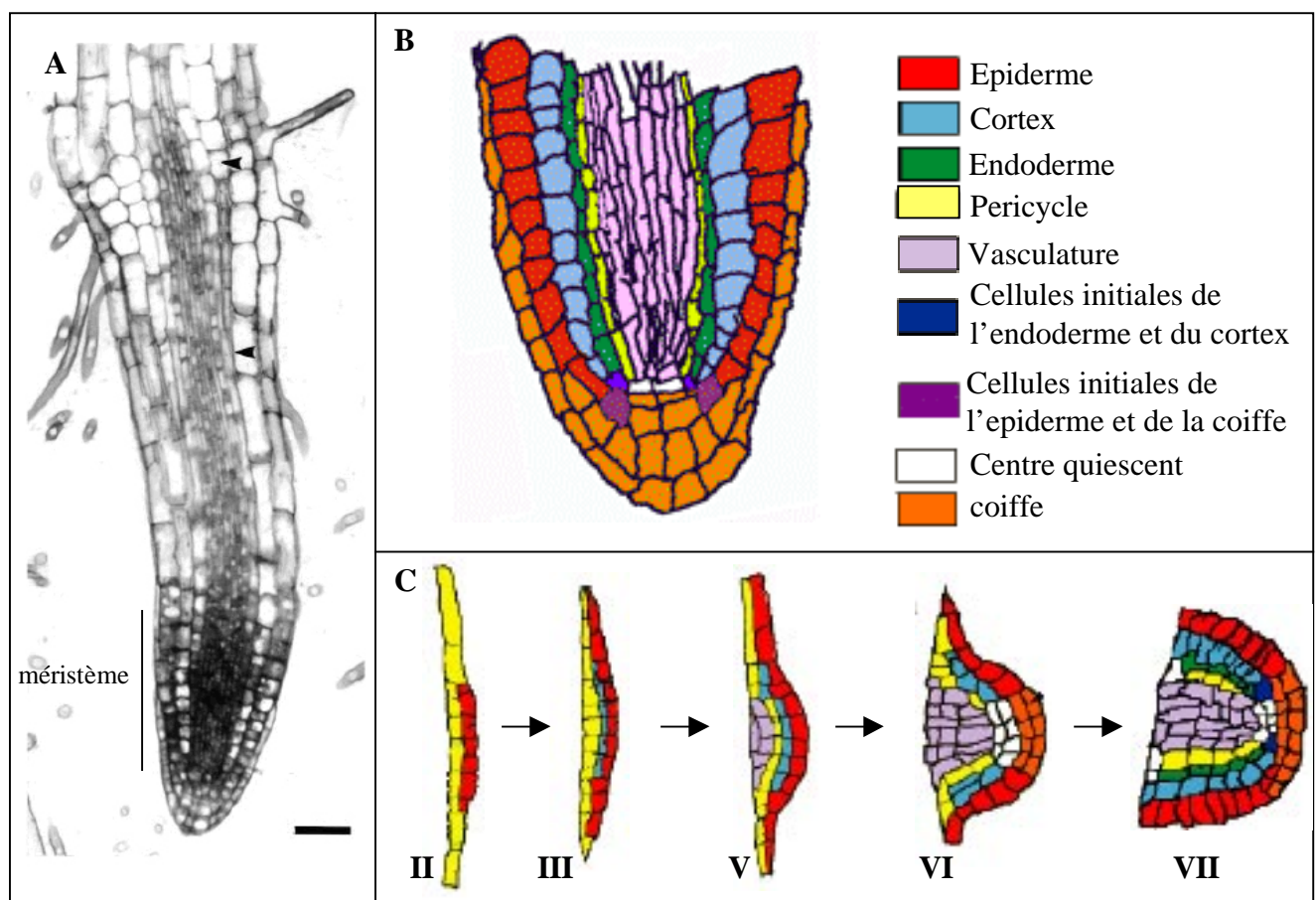
*Arabidopsis thaliana* (arabette des dames, Fig. 2 à 4) est une dicotylédone de la famille des Brassicaceae (crucifères). Elle n'a pas d'intérêt particulier au niveau agronomique, mais offre des avantages importants pour les recherches en génétique et biologie moléculaire (Page et Grossniklaus, 2002). D'une part, elle a un cycle de vie rapide, une petite taille adulte, et produit un grand nombre de graines. D'autre part, elle peut être efficacement transformée génétiquement à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*. Enfin, elle a un petit génome de 125 Mégabases dont le séquençage a été terminé récemment (the *Arabidopsis* Initiative, 2000) et de nombreux mutants sont disponibles. Pour ces différentes raisons, une grande partie des résultats présentés dans la suite de ce chapitre ont été obtenus chez cette plante modèle, qui a également été utilisée pour le travail décrit dans ce manuscrit.

### 1.3.3 Croissance associée à la prolifération au niveau des méristèmes primaires

La croissance cellulaire et les divisions cellulaires sont couplés dans les méristèmes primaires. La densité du cytosol et la faible vacuolisation des cellules en prolifération de ces méristèmes impliquent que l'augmentation de la masse cytosolique est importante lors de la croissance de ces cellules (Fig. 3A et 4A). Cela suggère entre autres un rôle important de la



**Figure 3 : le méristème apical caulinaire d'*Arabidopsis thaliana*.** A, Coupe longitudinale à travers le méristème apical caulinaire d'une plante 7 jours après germination. Bar, 25 µm. P : primordia des feuilles. D'après Medford *et al.*, 1992. B, organisation en 3 zones concentriques. La zone centrale (CZ) contient les cellules souches qui assurent le maintien du méristème. Les organes latéraux sont produits à partir des cellules de la zone périphérique (PZ). La zone médullaire (MZ) produit les tissus internes de la tige. D'après Bowman et Eshed, 2000.



**Figure 4 : le méristème racinaire d'*Arabidopsis thaliana*.** A, coupe longitudinale d'une racine primaire d'*Arabidopsis* 2 jours après germination colorée au bleu de toluidine. Barre, 50 µm. B, schéma montrant les différents types cellulaires de la racine primaire. Les nouvelles cellules sont formées autour du centre quiescent. C, principales étapes du développement des racines latérales. Une structure similaire à celle des racines est formée. La légende est la même qu'en B. A d'après Dolan *et al.* (1993). A et C d'après Malamy et Benfey (1997).

synthèse protéique lors de la croissance des cellules des méristèmes primaires, comme nous l'avons vu pour la croissance des cellules de levures (chap. 1.1.2).

Le nombre de cellules d'une plante dépend de la prolifération qui est coordonnée à la croissance cellulaire au niveau des méristèmes primaires. Certains gènes impliqués dans la mise en place et le maintien des méristèmes contrôlent la production de cellules et ainsi la croissance globale de la plante. Il s'agit notamment, au niveau du méristème apical caulinaire, de la voie de signalisation des récepteurs CLAVATA qui active la différenciation en inhibant le facteur de transcription WUSCHEL qui est impliqué dans la formation des cellules méristématiques (Clark, 2001). Citons également AINTEGUMENTA qui maintient la compétence méristématique des cellules lors de l'organogenèse (Mizukami et Fischer, 2000).

#### 1.3.4 Croissance associée à la différenciation

Les cellules de plantes peuvent augmenter de 10 à 1000 fois leur volume lors de leur différenciation, par un processus impliquant une forte vacuolisation et l'expansion de la paroi cellulaire primaire. Ainsi, les plantes se distinguent des animaux par leur faculté d'atteindre une taille importante avec un nombre relativement faible de cellules. Cette expansion cellulaire, associée à l'extension de la paroi cellulaire et l'accumulation d'eau dans la vacuole (turgescence), ne requiert que très peu d'augmentation de la masse cytoplasmique, et peut donc être considérée comme une manière économique de croître (Cosgrove, 1997). L'importance de la paroi cellulaire lors de cette expansion cellulaire est mise en évidence chez *Arabidopsis* par le nombre de mutants d'expansion cellulaire déficients dans la biosynthèse des éléments de la paroi (Nicol et Höfte, 1998). La paroi cellulaire est constituée de plusieurs couches de microfibrilles de cellulose et de chaînes d'hemicellulose dans une matrice de pectine très hydratée et pauvre en protéines (Nicol et Höfte, 1998). Ainsi, l'expansion cellulaire associée à l'expansion de la vacuole et de la paroi constitue un phénomène majeur de la croissance des plantes, qui ne nécessite qu'un faible investissement en synthèse de composants cytosoliques et notamment de ribosomes.

La corrélation positive observée entre le taux de ploïdie (nombre de copies du génome) et la taille d'une cellule végétale suggère que l'endoréduplication (duplication du génome sans mitose) exerce un contrôle sur l'expansion cellulaire (Kondorosi *et al.*, 2000). L'endoréduplication a lieu dans les cellules de l'hypocotyle, les trichomes et les cellules palissadiques des feuilles.

### 1.3.5 Croissance cellulaire polarisée

Le tube pollinique, qui délivre les cellules spermatiques à l'ovule, et les poils racinaires, qui jouent un rôle dans l'absorption d'eau au niveau des racines, grandissent de manière polarisée (Hepler *et al.*, 2001). Dans ces deux types cellulaires, une grande vacuole remplit l'excroissance cellulaire. Le cytoplasme est donc restreint à une fine couche, à l'exception d'une accumulation à l'apex de la cellule. Cette croissance particulière nécessite la formation d'un gradient de calcium caractérisé par une forte concentration à la pointe de la cellule en croissance. Les autres événements importants lors de cette croissance polarisée sont la réorganisation du cytosquelette et le trafic de vésicules membranaires qui transportent les précurseurs de la paroi en expansion (Hepler *et al.*, 2001).

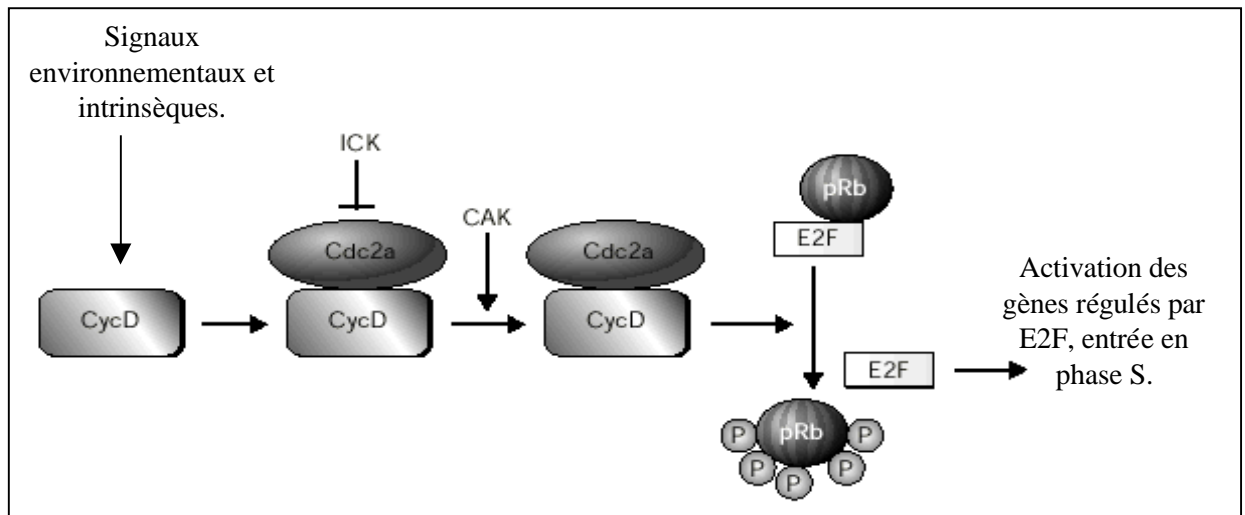
### 1.3.6 Cas particulier de l'albumen

L'albumen des angiospermes est un tissu triploïde résultant de la double fécondation (Fig. 2). Il débute son développement par des divisions du noyau qui ne sont pas suivies de divisions cellulaires, ce qui donne lieu à la formation d'un syncytium contenant 200 noyaux (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). Le syncytium se divise par la suite en cellules individuelles par un processus appelé cellularisation. Le syncytium est divisé en domaines mitotiques, ce qui montre que des cycles mitotiques peuvent avoir lieu sans divisions cellulaires (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). Les noyaux du syncytium sont entourés de cytoplasme dense et sont séparés les uns des autres par une large vacuole qui laisse la place aux nouveaux noyaux de l'albumen au fur et à mesure de leur prolifération (Mansfield *et al.*, 1991).

## 1.4 Coordination entre la croissance cellulaire et la division cellulaire chez les plantes

Si les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) sont conservées chez l'ensemble des eucaryotes (Fig. 1), les protéines régulatrices du cycle cellulaire des plantes sont plus proches de celles des animaux que de celles des levures. En effet, les séquences des kinases dépendantes des cyclines (CDKs, « cyclin dépendent kinases ») et des cyclines, ainsi que du facteur de transcription E2F et son répresseur, la protéine rétinoblastome (pRb), sont très conservées chez les animaux et les plantes (Stals et Inzé, 2001, Fig. 5). Le nombre de cyclines et de CDKs est plus élevé chez *Arabidopsis* que chez les animaux (Mironov *et al.*, 1999).

Plusieurs manipulations de gènes du cycle cellulaire ont été réalisées afin d'étudier le rôle de la division cellulaire sur la croissance et la morphogenèse des plantes. Ces modifications peuvent conduire à une inhibition des divisions cellulaires compensée par un agrandissement des cellules. Ainsi, des tabacs exprimant constitutivement une forme dominante négative de la CDK-*a* d'*Arabidopsis* (dont la sur-expression dans *Arabidopsis* est létale) ont un aspect normal mais



**Figure 5 : éléments clef du contrôle de la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire chez *Arabidopsis*.** Cdc2 est une CDK (kinase dépendante des cyclines) qui a besoin d'être activée par une cycline D (Cyc D) pour phosphoryler pRB (protéine du rétinoblasma). La phosphorylation de pRB libère le facteur de transcription E2F qui peut alors activer la transcription de ses gènes cibles. les protéines décrites dans ce modèle ont des homologues chez les animaux chez lesquels une cascade de signalisation similaire a lieu. ICK, Inhibiteurs de CDKs ; CAK, Kinase Activatrice de CDKs. D'après Meijer et Murray, 2001.

sont constitués d'un nombre réduit de cellules plus larges par rapport au contrôle (Hemerly *et al.*, 1995). De même, les feuilles d'une arabette sur-exprimant KRP2, un inhibiteur de CDKs, sont formées de cellules moins nombreuses mais plus grandes que celle d'une plante sauvage (De Veylder *et al.*, 2001a). Ces résultats sont cohérents avec des analyses antérieures qui ont montré que des primordium foliaires de blé dont la division est inhibée par irradiation  $\gamma$  poursuivent leur croissance (Haber, 1962). D'autre part, les plantes terrestres ont évolué à partir d'algues vertes unicellulaires dont certaines, comme les caulerpes, sont capables de morphogenèse complexe en l'absence de division cellulaire (Kaplan et Hagemann, 1991). Si cela amène l'idée que la multicellularité des plantes n'est pas à l'origine de leur morphologie, il n'en est pas moins vrai que les divisions cellulaires sont nécessaires à la morphogenèse des plantes terrestres (Meijer et Murray, 2001). Cependant, aucune de ces analyses n'indique si le rapport entre le volume du cytosol et le volume de la vacuole est altéré dans ces cellules anormalement grandes.

Dans d'autres cas, il a été possible de modifier la vitesse de croissance cellulaire en surexprimant des gènes du cycle cellulaire. D'une part, L'expression ectopique de la cycline CYCB1:1 qui n'est normalement exprimée que lors du passage G2 à M, accélère la croissance des racines d'*Arabidopsis* sans induire de primordia supplémentaires et sans changer la taille des cellules (Doerner *et al.*, 1996). De plus, des plants de tabac sur-exprimant ectopiquement la cycline D2 d'*Arabidopsis* ont une croissance accélérée, due à un raccourcissement de la phase G1, ce qui n'altère pas la taille des cellules (Cockcroft *et al.*, 2000). Enfin, la sur-expression de CKS1At, une protéine capable de s'associer aux CDKs, conduit à une augmentation de la durée des phases G1 et G2 du cycle cellulaire, une diminution de la taille des méristèmes, et une réduction de la vitesse de croissance des racines et des feuilles (De Veylder *et al.*, 2001b). Ces modifications de la vitesse de croissance au niveau des méristèmes peuvent être expliquées, soit par un effet direct de ces gènes du cycle cellulaire sur la croissance cellulaire, soit via une activation de la division cellulaire. En effet, il est possible que certaines protéines décrites comme des régulateurs du cycle cellulaire soient en réalité des régulateurs directs de la croissance cellulaire, comme c'est le cas pour la cycline D de drosophile (Datar *et al.*, 2000).

## **1.5 Contrôle de la croissance des plantes**

### *1.5.1 Contrôle de la croissance des plantes par les hormones*

Les hormones de plantes sont de petites molécules organiques qui interviennent dans la signalisation entre les cellules. Les cinq classes d'hormones qui ont été le plus étudiées sont les auxines, les cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique et les gibbérellines, mais d'autres hormones comme les brassinostéroïdes, l'acide salicylique et les jasmonates ont été découvertes



plus récemment et le répertoire des hormones connues n'est probablement pas complet (Kende et Zeevaart, 1997). Elles interviennent dans la plupart des aspects du développement de la plante, notamment la croissance, la prolifération, la germination, l'ouverture des stomates et les réactions de défense.

L'observation de plantes traitées par les hormones, ainsi que des mutants défectueux dans leur biosynthèse ou leur réponse, montrent clairement l'importance de ces substances dans la régulation de la croissance (Kende et Zeevaart, 1997). Ainsi, les gibbérellines induisent l'élongation notamment au niveau de la partie aérienne, et des mutants de biosynthèse ou de réponse de cette hormone sont nains (Richards *et al.*, 2001). Les cytokinines et les auxines sont les deux hormones dont le rôle dans la prolifération cellulaire est le plus évident, puisqu'elles agissent de concert pour induire la prolifération de cellules en culture. Ce phénomène implique, entre autres, l'activation de la cycline D, puisque sa sur-expression constitutive permet d'induire la formation de cals en absence de cytokinine chez *Arabidopsis* (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). De plus, ces deux hormones ont des effets différents *in planta* puisque les auxines favorisent la rhizogenèse alors que les cytokinines favorisent l'activité du méristème apical caulinaire et la croissance des bourgeons latéraux.

#### 1.5.2 *État nutritif et croissance*

Bien que les plantes soient autotrophes pour le carbone, certains de leurs organes et cellules non photosynthétiques, ou puits (notamment les racines et les méristèmes) peuvent être considérés comme hétérotrophes. Ainsi, des variations de facteurs environnementaux, comme la lumière, l'eau, la température et les attaques par des pathogènes ou des herbivores, peuvent diminuer fortement la capacité photosynthétique des feuilles (tissus source) et la disponibilité en carbohydrates. Les principales études portant sur les mécanismes de réponse aux carences en sucre ont été réalisées sur des pointes racinaires excisées et des cellules en culture (pour revue, Yu, 1999). Ces études ont montré que les cellules de plantes répondent aux carences en sucre en activant l'utilisation de sources alternatives de carbone (lipides, amidons et protéines), et en réprimant les fonctions cellulaires consommatrices de sucres (synthèse d'amidon, synthèse et stockage de protéines, cycle cellulaire, assimilation de l'azote, respiration, métabolisme du saccharose). Ces phénomènes, qui permettent aux cellules en culture de survivre six jours sans sucre, sont associés à une augmentation de la taille des vacuoles et une importante activité autophagique qui semble résulter de la baisse de l'apport de substrats carbonés aux mitochondries (Aubert *et al.*, 1996). Ces résultats sont confortés par des expériences sur plantes entières, puisqu'une protéolyse est induite rapidement, et en premier dans les tissus puits, lorsque

des plants de maïs sont privés de lumière d'une manière plus prolongée que lors d'un cycle normal (Brouquisse *et al.*, 1998).

Riou-Khamlichi *et al.* (2000) ont récemment mis en évidence un lien direct entre l'activation de la progression à travers le cycle cellulaire et la disponibilité en sucres. En effet, les taux d'ARNm des cyclines D2 et D3, ainsi que l'activité de leurs CDKs correspondantes, augmentent fortement lorsque du saccharose est ajouté à des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* préalablement cultivées en absence de sucre. Ce contrôle transcriptionnel de cyclines n'est pas une conséquence de l'activation du cycle cellulaire puisque qu'il n'est pas inhibé par la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (au niveau de l'élongation) qui bloque la progression à travers le cycle cellulaire. Par contre, l'activation de ces cyclines requiert l'activité de protéines phosphatases et est nécessaire à l'activation de la cycline D3 par les cytokinines. Ainsi, la disponibilité en sucre est perçue au niveau du cycle cellulaire par une voie de signalisation comprenant certaines cyclines D, qui contrôlent le passage G1 à S.

Les plantes sont capables de produire les molécules organiques dont elles ont besoin à partir de la photosynthèse et en particulier les aminoacides et les vitamines dont elles ont besoin. Elles ne subissent donc pas de carence directe en aminoacides, mais sont confrontées à des problèmes de disponibilité en azote et autres éléments minéraux essentiels. Les plantes réagissent aux carences en nitrate, en ammonium et en phosphate en modifiant leur architecture racinaire. Ainsi, lorsque les racines sont exposées à des sources localisées de l'un de ces nutriments, l'allongement des racines secondaires est stimulé au niveau de la zone la plus riche (Leyser et Fitter, 1998). Un composant de la voie de signalisation permettant ce type de modification racinaire en réponse au nitrate a été identifié (Zhang et Forde, 1998). Il s'agit d'un facteur de transcription de la famille des MADS-box.

## **1.6 La croissance cellulaire chez les animaux**

Les cellules animales ne sont pas entourées d'une paroi et ne grandissent pas par turgescence mais principalement par une augmentation de leur masse cytosolique. Leur croissance est ainsi contrôlée en grande partie au niveau de la synthèse protéique. Celle-ci est régulée directement par la disponibilité en aminoacides et une carence en aminoacides essentiels induit une diminution de la synthèse protéique globale (Kimball et Jefferson, 2000). La croissance cellulaire est aussi activée au niveau de l'organisme par des signaux intracellulaires transmis par les facteurs de croissance (Conlon et Raff, 1999). Une augmentation de la prolifération accompagne généralement la croissance cellulaire induite par les facteurs de croissance.

L'animal modèle le plus utilisé pour l'étude de la croissance cellulaire est la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Dans l'embryon de drosophile, les cycles de division ne sont pas couplés à une croissance cellulaire puisque qu'il s'agit de sous-divisions d'une cellule géante (l'œuf fertilisé) en cellules de plus en plus petites (Edgar et Lehner, 1996). Par contre, une intense croissance cellulaire a lieu lors du développement larvaire, ce qui conduit à une augmentation de la masse de la drosophile d'un facteur 200 avant l'éclosion (Britton et Edgar, 1998). Cette croissance cellulaire est associée à une endoréplication dans certains tissus comme les glandes salivaires, les tissus adipeux, les muscles et l'épiderme, et à une forte activité mitotique dans d'autres tissus dont les disques imaginaux des ailes et des yeux, les neuroblastes et les cellules germinales.

Une catégorie de mutations caractérisées par une létalité récessive et un retard de développement sans conséquences sur la taille finale à l'état hétérozygote ont été nommées mutations *Minutes* chez la drosophile (Lambertsson, 1998). Tous les gènes *Minute* actuellement séquencés codent des protéines ribosomales, ce qui suggère que le niveau de synthèse protéique globale influence la vitesse de croissance des cellules, et donc des organes, mais non leur taille finale. Des études génétiques plus récentes ont permis d'identifier des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire chez les animaux et notamment la voie de signalisation des facteurs de croissance de type insuline qui semble relativement bien conservée entre les mammifères et les insectes (Prober et Edgar, 2001). Ces travaux ont mis en évidence le rôle central des protéines mTOR et dTOR dans le contrôle de la croissance cellulaire

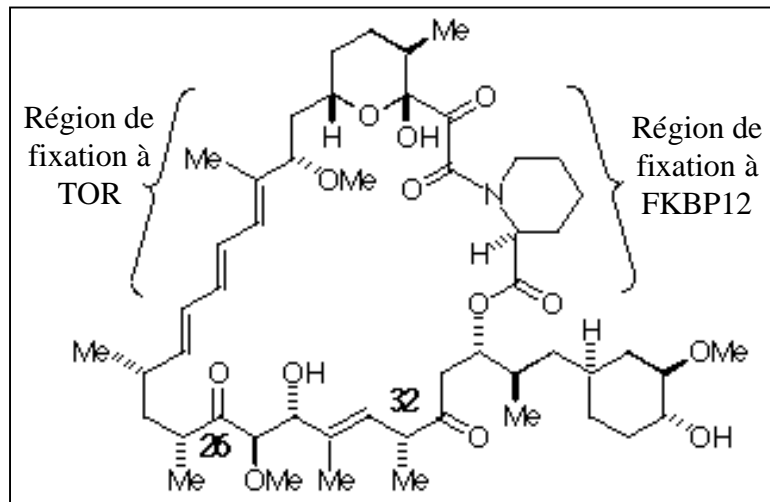
Les protéines TOR ont ainsi une place essentielle dans le contrôle de la croissance cellulaire, aussi bien chez les levures que chez la drosophile et les mammifères. Le chapitre suivant détaille la structure et la fonction des protéines TOR en mettant en évidence sa conservation des levures aux animaux et l'intérêt de l'étudier chez les plantes.

## **2 La voie de signalisation de TOR**

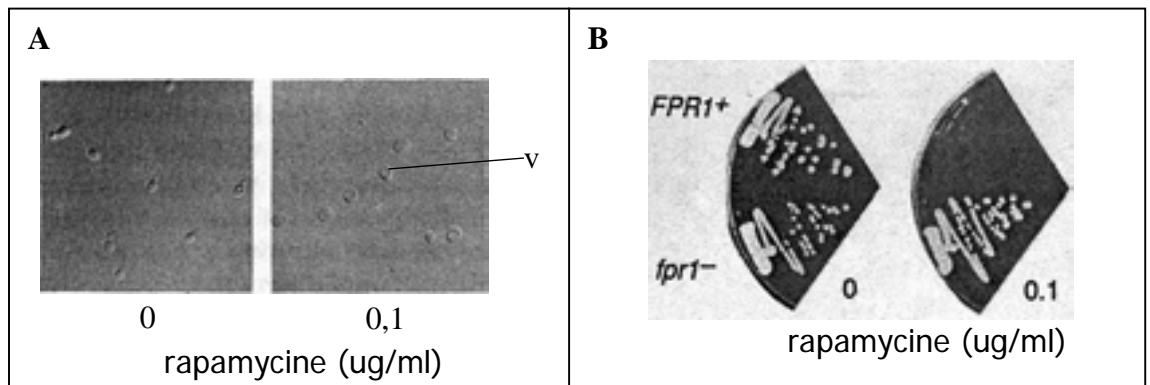
### **2.1 La découverte de la rapamycine et de ses cibles**

#### *2.1.1 La rapamycine*

La rapamycine (Fig. 6) a été découverte en 1975 par une équipe qui cherchait de nouveaux antibiotiques à partir de bactéries du sol (Vézina *et al.*, 1975). Il s'agit d'un



**Figure 6 : Structure de la rapamycine.** Les régions d'interaction avec TOR et FKBP12 sont indiquées.



**Figure 7 : effet de la rapamycine sur *S. cerevisiae* et identification des gènes impliqués dans la sensibilité à cette drogue.** A, observation au microscope de cellules diploïdes de levure en phase exponentielle de croissance, traitées 5h avec 100 ng/ml de rapamycine (à droite) ou sans drogue (à gauche). L'arrêt en phase G1 est caractérisé par la présence de grandes cellules sans bourgeon et avec une large vacuole (v). B, phénotype obtenu lors du crible de mutants résistants à la rapamycine : une souche *fpr1-* n'exprimant pas FKBP12, incubée 3 jours avec ou sans rapamycine, est comparée à une souche sauvage (*FPR1+*). Les mutations *tor1-1* et *tor2-1* (voir texte) confèrent le même degré de résistance. D'après Heitman *et al*, 1991.

antibiotique produit par une souche de *Streptomyces hygroscopicus* (Vézina *et al.*, 1975 ; Staunton et Wilkinson, 1997). Son nom fait référence à “Rapa Nui”, le nom indigène de l’île de Pâques d’où provient cette bactérie. Son spectre d’action est très large puisqu’elle cause un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 aussi bien chez des levures et des champignons que chez des cellules animales (Fig. 7A). Elle n’affecte cependant pas les bactéries. Des analogues de la rapamycine sont en cours d’essais cliniques en chimiothérapie et en transplantation grâce à leur action anti-proliférative et immunosuppressive (inhibition de la prolifération des lymphocytes T) (Hidalgo et Rowinsky, 2000 ; Neuhaus *et al.*, 2001).

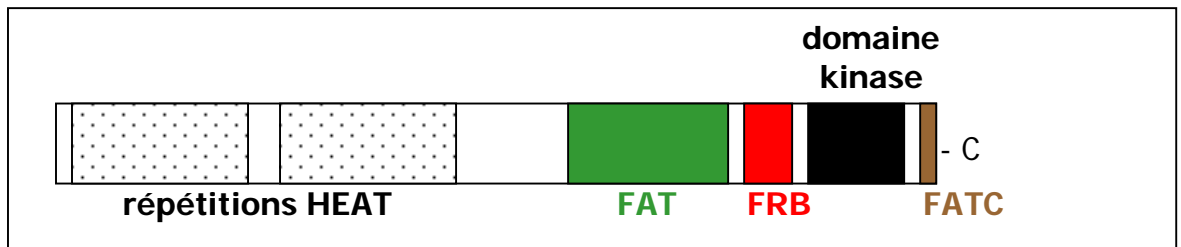
### 2.1.2 Découverte des protéines TOR

Le criblage de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* résistant à la rapamycine a permis d’identifier trois gènes impliqués dans la toxicité de cet antibiotique (Fig. 7B ; Heitman *et al.*, 1991 ; Cafferkey *et al.*, 1993). Le premier de ces gènes, *FPR1*, code une peptidyl-prolyl isomérase de 12 kDa appelée FKBP12 (pour FK506-binding protein, car son activité est inhibée par la molécule FK506). Des cellules délétées de *FPR1* sont viables et résistantes à la rapamycine, ce qui montre que ce n’est pas l’inhibition de l’activité peptidyl-prolyl isomérase de FKBP12 qui est la cause de l’effet anti-prolifération de la rapamycine, mais plutôt l’inhibition FKBP12-dépendante d’un autre composant (Heitman *et al.*, 1991). Les deux autres gènes identifiés, nommés *TOR1* et *TOR2* pour target of rapamycin 1 et 2 (ou *DDR1* et *DDR2* pour dominant rapamycin resistance 1 et 2), codent des protéines très similaires, de 2470 et 2474 résidus aminoacides respectivement, qui sont les véritables cibles de la rapamycine (Kunz *et al.*, 1993 ; Cafferkey *et al.*, 1993 ; Helliwell *et al.*, 1994).

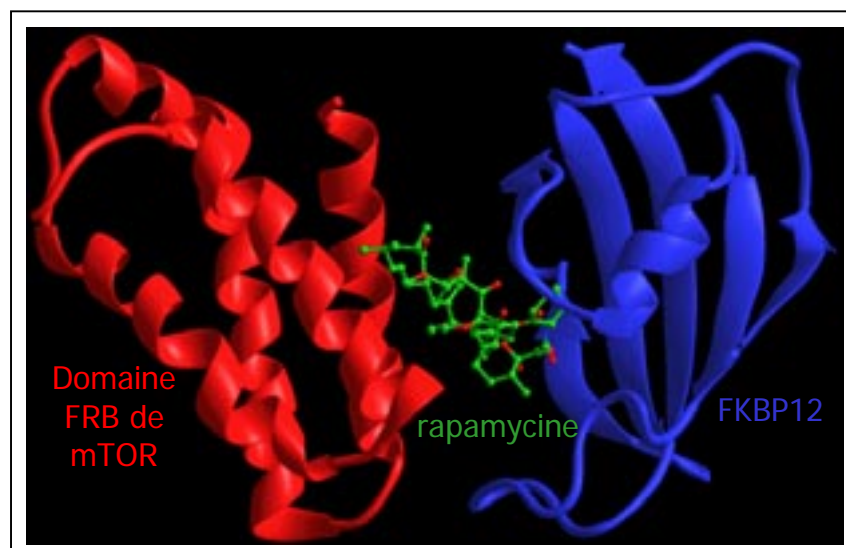
Des approches biochimique (purification sur colonnes d’affinité) et génétique (double hybride) ont permis d’identifier une protéine de mammifère capable de fixer le complexe FKBP12-rapamycine. Celle-ci s’est révélée être homologue aux protéines TOR1 et TOR2 de levures (Brown *et al.*, 1994 ; Chiu *et al.*, 1994 ; Sabatini *et al.*, 1994 ; Sabers *et al.*, 1995). Elle présente en effet 42 % et 45 % d’identité avec TOR1 et TOR2 respectivement. Cette protéine est généralement appelée mTOR pour mammalian Target Of Rapamycin, mais d’autres noms lui ont été donnés par les différentes équipes qui l’ont découverte : FRAP (FKBP-rapamycin associated protein), RAFT (rapamycin and FKBP12 target) ou RAPT1 (rapamycin target).

### 2.1.3 Caractéristiques moléculaires des protéines TOR

Les protéines TOR sont de grandes protéines-kinases (masse moléculaire d’environ 280 kDa, Fig. 8) appartenant à la famille des kinases apparentées aux PIKs (« PIK-related kinases »), dont font également partie des protéines impliquées dans la préservation de l’intégrité de l’ADN



**Figure 8 : Structure représentative des protéines TOR** montrant la position des différents domaines. Répétition HEAT : répétition présente dans les protéines Huntingtin, facteur d'élongation 3, sous-unité A de la protéine phosphatase PP2A et TOR1 ; FAT : domaine conservé chez les protéines FRAP, ATM et TRRAP ; FRB : domaine de fixation à FKBP12-Rapamycine ; FATC : domaine C-terminal conservé chez les protéines FRAP, ATM et TRRAP.



**Figure 9 : Le complexe FRB/rapamycine/FKBP12.** La rapamycine (au centre, en vert) forme un complexe avec FKBP12 (à gauche, en bleu) et le domaine FRB de mTOR (à droite, en rouge). La formation de ce complexe conduit à l'inhibition de l'activité de TOR et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. La plupart des contacts se font entre la rapamycine et les protéines, alors que peu de contacts existent entre les protéines elles mêmes. D'après Choi *et al.*, 1996.

ou dans le contrôle du cycle cellulaire telles que ATM (ataxia telangiectasia mutated), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), Mec1p (mitosis entry checkpoint), ATR (ATM and RAD3 related) et TRRAP (transformation/transcription domain associated protein) (pour revue, Kuruvilla et Schreiber, 1999). Toutes ces protéines possèdent une partie C-terminale homologue à celle des phosphatidylinositol 3-kinases et phosphatidylinositol 4-kinase, mais ont une activité protéine-kinase au lieu d'une activité lipide-kinase. Ainsi, mTOR a une activité sérine/thréonine kinase (Brunn *et al.*, 1997 ; Burnnet *et al.*, 1997 ; Isotani *et al.*, 1999). La conservation fonctionnelle des domaines kinases des protéines TOR a été démontrée par le fait que des protéines de fusion entre les deux tiers N-terminaux de TOR1 ou TOR2 de *S. cerevisiae* et la partie C-terminale, comprenant le domaine kinase, de mTOR sont capables de compléter les mutants de levure *tor1* et *tor2* respectivement (Alarcon *et al.*, 1996).

Le domaine kinase des protéines TOR est suivi d'une petite région d'une trentaine de résidus aminoacide à l'extrémité C-terminale, qui est conservée chez ATM et dont la présence est essentielle pour l'activité de la protéine (Takahashi *et al.*, 2000). Ce domaine est appelée FATC, pour FRAP, ATM et TRRAP C-terminal (Bosotti *et al.*, 2000).

Le domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding), situé en amont du domaine kinase et spécifique des protéines TOR, est la région à laquelle se fixe le module FKBP12-rapamycine lors de la formation du complexe inhibiteur TOR-rapamycine-FKBP12. La résolution, par cristallographie, de la structure de ce complexe a révélé une majorité d'interactions rapamycine-protéine et peu d'interactions FKBP12-FRB (Fig. 9 ; Choi *et al.*, 1996 ; Liang *et al.*, 1999). Les deux mutations ponctuelles de TOR (*TOR1-1* et *TOR2-1*) rendant les levures résistantes à la rapamycine sont des substitutions d'un résidu sérine (Ser<sup>1972</sup> pour TOR1 et Ser<sup>1975</sup> pour TOR2) du domaine FRB impliqués dans l'interaction avec le module FKBP12-rapamycine (Stan *et al.*, 1994). De même, des cellules humaines de foie ou de rhabdomyosarcomes, transformées avec un gène *mTOR* porteur d'une mutation conduisant à la substitution du résidu Ser<sup>2035</sup> (l'équivalent des résidus Ser<sup>1972</sup> de TOR1 et Ser<sup>1975</sup> de TOR2) en Ile, sont résistantes à la rapamycine (Brunn *et al.*, 1997). Le rôle du domaine FRB pour l'activité de mTOR a été mis en évidence par le fait que sa micro-injection dans des cellules d'ostéosarcome humain conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et un blocage de l'activité auto-kinase de mTOR (Vilella-Bach *et al.*, 1999). Cet effet du domaine FRB est aboli par une mutation du résidu Trp<sup>2027</sup>, mais non par la mutation du résidu Ser<sup>2035</sup>. Cela montre que des sites différents de ceux qui sont impliqués dans l'interaction avec la rapamycine jouent un rôle dans la fonction du domaine FRB. Ainsi, ce domaine pourrait interagir *in vivo* avec un activateur de mTOR, et sa présence en excès inhiberait mTOR en séquestrant l'activateur (Vilella-Bach *et al.*, 1999).

Dans leur partie N-terminale, qui est nettement moins conservée que les 3 domaines décrits précédemment, les protéines TOR possèdent des motifs répétés d'une quarantaine de

résidus appelés HEAT (pour Huntingtin, facteur d'élongation 3, sous-unité A de la protéine phosphatase PP2A et TOR1, les premières protéines dans lesquelles ces motifs ont été trouvés) (Andrade et Bork, 1995). Ces répétitions HEAT forment des paires d'hélices  $\alpha$  antiparallèles et sont impliquées dans des interactions protéine-protéine, ce qui suggère que TOR pourrait faire partie d'un complexe multi-protéique (Groves *et al.* 1999 ; Andrade et Bork, 1995). Une partie des domaines HEAT de mTOR interagit avec la gephyrine, une protéine fixant la tubuline impliquée dans l'assemblage des récepteurs neuronaux de la glycine (Sabatini *et al.* 1999). D'autre part, des expériences de fractionnement sub-cellulaire et d'immunolocalisation couplées à des analyses de délétions de TOR2 ont permis d'impliquer les répétitions HEAT dans l'association de cette protéine avec la membrane plasmique (Kunz *et al.*, 2000).

Enfin, un domaine FAT (pour FRAP, ATM et TRRAP), caractéristique des PIK-related kinases et pouvant être impliqué dans des interactions entre protéines, a été identifié environ 500 résidus en amont du domaine FRB (Bosotti *et al.*, 2000).

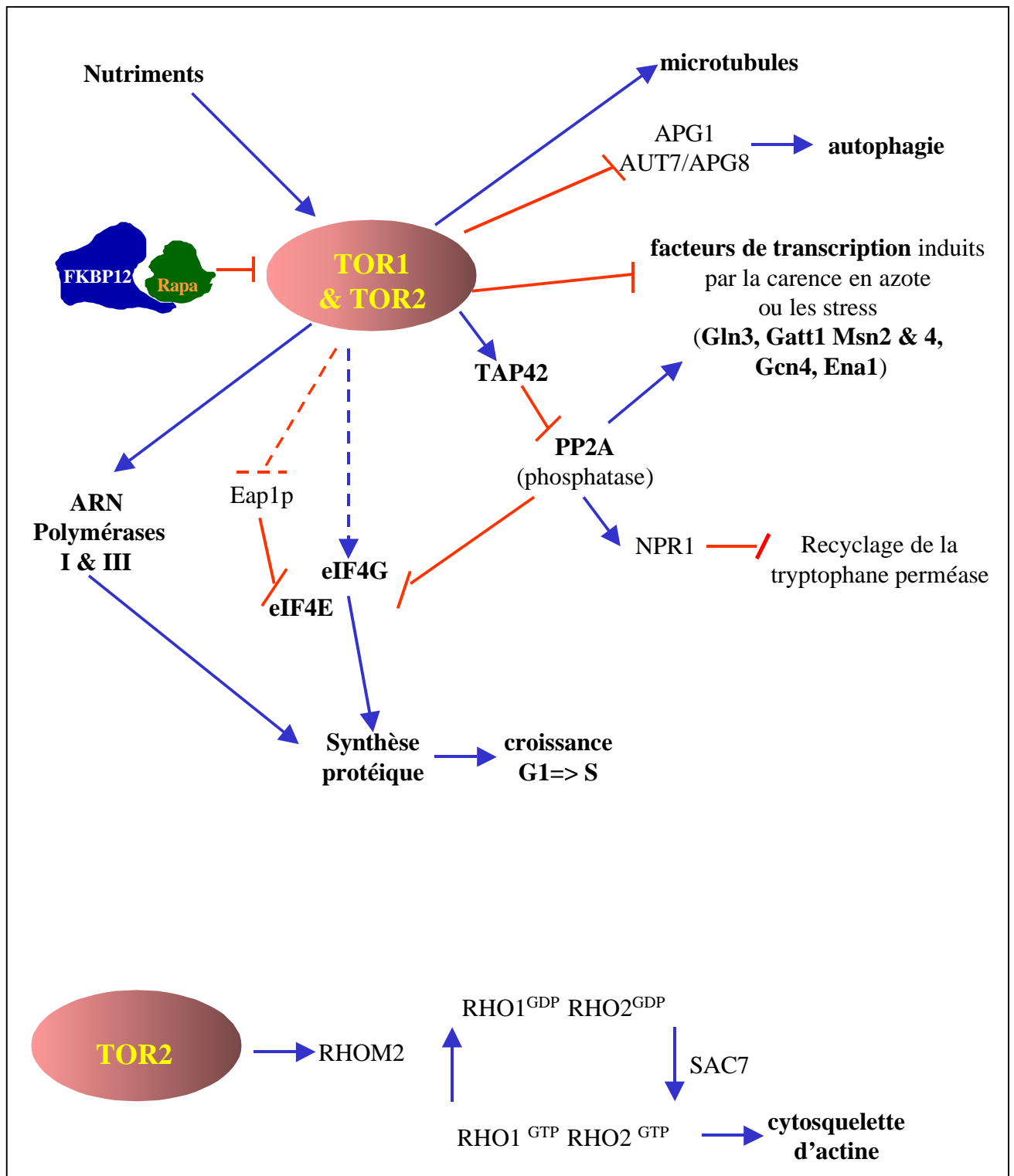
Des homologues des gènes *TOR* de *S. cerevisiae* et de mammifères ont été caractérisés chez *Cryptococcus neoformans*, *Drosophila melanogaster* et *Schizosaccharomyces pombe* (Cruz *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Oldham *et al.*, 2000 ; Weisman et Choder, 2001), mais sont aussi identifiables dans d'autres génomes eucaryotes séquencés ou en cours de séquençage.

Les quatre prochains sous-chapitres présentent en détail les connaissances actuelles sur le rôle des protéines TOR chez les levures et les animaux. Elles sont le résultat d'une recherche très intense menée depuis une dizaine d'années en raison d'un intérêt croissant pour l'étude du contrôle de la croissance cellulaire et des avantages expérimentaux liés à l'utilisation de la rapamycine. Afin d'éviter tout amalgame, nous présenterons la voie de TOR organisme par organisme. Nous mettrons ensuite en évidence les éléments de cette voie de signalisation qui ont été conservés des levures aux animaux, puis nous envisagerons la possibilité de sa conservation chez les plantes.

## **2.2 La voie de TOR chez *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 10)**

La voie de TOR a été intensément étudiée chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* qui est particulièrement adaptée aux analyses génétiques. Pour chaque étude décrite ci-dessous, il a été démontré que les mécanismes inhibés par la rapamycine sont dépendants des protéines TOR par le fait qu'ils ne sont pas inhibés chez un mutant délété de FKBP12 (*fpr1*) ou portant une version résistante à la rapamycine de TOR1 (*tor1-1*).





**Figure 10 : modèle de la voie de TOR de *Saccharomyces cerevisiae*.** Le contrôle du cytosquelette d'actine est présenté à part, car il s'agit d'une fonction spécifique de TOR2 qui n'est pas inhibée par la rapamycine.

*S. cerevisiae* possède deux gènes *TOR* (*TOR1* et *TOR2*) codant des protéines identiques à 67 % au niveau de leurs séquences d'acides aminés (Helliwell *et al.*, 1994). Des souches hétérozygotes pour un allèle délété de *TOR2* ne donnent, après sporulation, que des descendants (seulement deux spores par tétrades) portant l'allèle sauvage, ce qui démontre que *TOR2* est un gène essentiel (Kunz *et al.*, 1993). Par contre, *TOR1* est un homologue non-essentiel de *TOR2*, puisque des cellules *tor1 TOR2* sont viables et ne présentent qu'un très léger retard de croissance (Helliwell *et al.*, 1994). La délétion de *TOR2* dans une souche *TOR1+* conduit à un arrêt au hasard du cycle cellulaire après trois à quatre divisions. Par contre, la délétion de *TOR2* dans une souche *tor1*, de même qu'un traitement à la rapamycine, induit un arrêt en phase G1 dès la première génération, associé à la formation de larges cellules non bourgeonnantes n'ayant pas dupliqué leur ADN, de grandes vacuoles, et accumulant du glycogène (Kunz *et al.*, 1993 ; Helliwell *et al.*, 1994 ; Barbet *et al.*, 1996 ; Helliwell *et al.*, 1998). Ces analyses génétiques ont démontré qu'il existe deux fonctions dépendantes des gènes *TOR*. L'une de ces fonctions, redondante à *TOR1* et *TOR2* et sensible à la rapamycine, est responsable de l'arrêt en G1 causé par la délétion des deux gènes. L'autre fonction, unique à *TOR2* et résistante à la rapamycine, n'est pas liée directement au cycle cellulaire, mais est quand même essentielle.

### 2.2.1 Contrôle de la biosynthèse des ribosomes et de la traduction

Barbet *et al.* (1996) ont montré, par des expériences d'incorporation de méthionine radioactive, que la rapamycine, ou la délétion de *TOR1* et *TOR2*, inhibe la synthèse protéique d'une manière encore plus importante que la cycloheximide, un inhibiteur de l'élongation de la traduction. Cette inhibition de la traduction ne se fait pas au niveau de l'élongation puisque la rapamycine n'induit pas d'accumulation de polysomes (ribosomes associés aux ARNm) en absence de cycloheximide. Par contre, l'inhibition de *TOR1* et *TOR2* induit une diminution rapide des ribosomes polysomiaux associée à une augmentation des monosomes, ce qui est caractéristique d'un blocage de l'initiation de la traduction (Barbet *et al.* 1996). Le blocage du cycle cellulaire induit par la rapamycine implique la diminution de la traduction de la cycline G1 CLN3 (voir sous-chapitre 1.1.2). En effet, l'expression de CLN3 sous le contrôle du promoteur et de la partie 5' non traduite d'un gène codant une protéine de phase stationnaire supprime l'arrêt en G1 induit par la rapamycine (Barbet *et al.*, 1996).

Berset *et al.* (1998) ont montré que le taux d'eIF4G1 et eIF4G2, les deux isoformes du facteur d'initiation de la traduction eIF4G de *S. cerevisiae*, sont fortement et rapidement diminués après ajout de rapamycine à des cellules en phase exponentielle de croissance, alors que le taux d'autres facteurs d'initiation de la traduction tels eIF4E et eIF4A reste inchangé. De plus, les auteurs ont montré que la rapamycine agit sur la stabilité de la protéine eIF4G plutôt

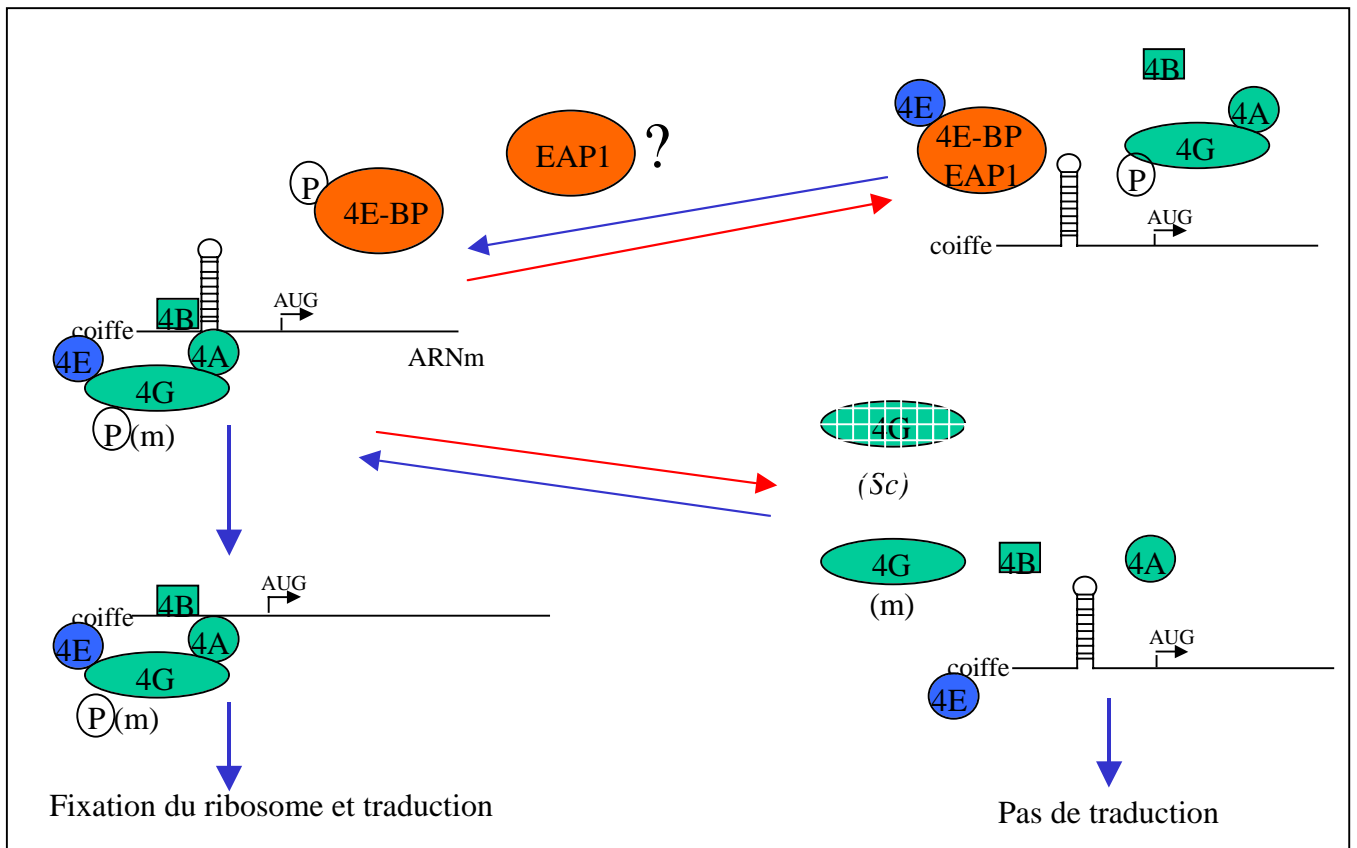
que sur sa synthèse. eIF4G étant une sous-unité essentielle du complexe eIF4F d'initiation de la traduction des ARNm coiffés (Goyer *et al.*, 1993 ; Fig. 11). L'implication de la voie de TOR dans le contrôle du complexe eIF4F a été confortée par le fait que la délétion du gène *EAP1*, codant une protéine capable d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe en entrant en compétition avec eIF4G pour la fixation à eIF4E, confère une résistance partielle à la rapamycine (Cosentino *et al.*, 2000).

En plus de leur contrôle sur l'initiation de la traduction, TOR1 et TOR2 régulent la synthèse protéique d'une façon plus globale par le biais de la biosynthèse des ribosomes. En effet, des expériences de transcription *in vitro* à partir d'extraits de cellules de levure traitées pendant 24 h à la rapamycine ont mis en évidence une inhibition importante de la transcription de l'ARNr 5S et de l'ARNt<sup>Leu</sup>, qui dépendent de l'ARN polymérase III, ainsi que de l'ARNr 35S dont la transcription dépend de l'ARN polymérase I (Zaragoza *et al.*, 1998). Une autre équipe a montré que la rapamycine induit une diminution très rapide du taux d'ARNm codant pour les protéines ribosomales, plus vraisemblablement au niveau de la transcription que de la stabilité des transcrits (Powers et Walter, 1999). L'analyse des gènes dont l'expression est modifiée par la rapamycine, à partir de puces à ADN représentant le génome complet de *S. cerevisiae*, a confirmé ces résultats en révélant une répression globale de la majorité des gènes codant les protéines ribosomales cytoplasmiques (Cardenas *et al.*, 1999 ; Hardwick *et al.*, 1999).

Enfin, les protéines TOR contrôlent aussi la synthèse protéique au niveau de la stabilité des ARNm (Albig et Decker, 2001). Cela implique la déadenylation puisque les ARNm qui sont dégradés le plus rapidement par la rapamycine sont caractérisés par une courte queue polyA.

## 2.2.2 Une phosphatase dans la voie de signalisation de TOR

L'activation de certains éléments en aval des protéines TOR, dont la synthèse protéique, nécessite l'inactivation d'une phosphatase. Cela fait intervenir la phosphorylation d'une protéine essentielle appelée TAP42 qui est phosphorylée par TOR2, et dont la délétion confère une bonne résistance à la rapamycine (Di Como et Arndt, 1996 ; Jiang et Broach, 1999). TAP42 s'associe à la sous-unité catalytique des protéines phosphatases de type 2A (PP2A) en conditions optimales de croissance, mais cette association est inhibée en phase stationnaire ou après traitement à la rapamycine (Di Como et Arndt, 1996). TAP42 entre ainsi en compétition avec les deux autres sous-unités de la PP2A pour la fixation à la sous-unité catalytique. TIP41, une protéine capable d'interagir avec TAP42, intervient dans cette voie de signalisation en inhibant TAP42 lorsque les protéines TOR sont inhibées (Jacinto *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel l'inhibition de la phosphatase agit sur les cibles des protéines TOR reste à élucider.



**Figure 11 : modèle des contrôles de l'initiation de la traduction chez les mammifères et *S. cerevisiae*.** La fixation de eIF4E (4E) à la coiffe permet à tout le complexe d'initiation de la traduction eIF4F de se positionner en 5' de l'ARNm (à gauche). eIF4A (4A) est l'hélicase qui déroule l'ARNm, ce qui permet à la traduction d'avoir lieu. eIF4B (4B) est un cofacteur de eIF4A. En séquestrant eIF4E, 4E-BP (mammifères) ou EAP1 (*S. cerevisiae*) empêche la fixation du complexe eIF4F à l'ARNm et inhibe la traduction (en haut à droite). La phosphorylation de 4E-BP libère eIF4E et induit la traduction mais la manière dont EAP1 est régulée n'est pas connue. La formation du complexe eIF4F est aussi régulée au niveau de eIF4G, par phosphorylation chez les mammifères (m), et par déstabilisation chez *S. cerevisiae* (Sc) (en bas à droite). Les ARNm fortement structurés en 5' semblent particulièrement dépendants de eIF4F pour leur traduction, notamment chez les mammifères.

### 2.2.3 Contrôle de l'autophagie et du transport membranaire

L'autophagie est un processus eucaryotique, induit par la carence nutritive, par lequel des composants cytoplasmiques sont délivrés aux autophagosomes chez *S. cerevisiae* (l'équivalent des lysosomes de mammifères) (Klionsky et Emr, 2000). Les autophagosomes fusionnent ensuite avec la vacuole où leurs composants (protéines, lipides, sucres et nucléotides) sont dégradés par des hydrolases vacuolaires afin d'être recyclés. La rapamycine est capable d'induire, en milieu riche, la production d'autophagosomes et l'augmentation de l'activité phosphatase caractéristique de l'autophagie (Noda et Ohsumi, 1998). Cette induction de l'autophagie par la rapamycine n'a pas lieu avec les 14 mutants *apg*, déficitaires pour des gènes *APG* impliqués dans l'autophagie, ce qui montre que les protéines TOR agissent en amont des protéines APGs (Noda et Ohsumi, 1998). Une étude complémentaire a montré que les protéines TOR régulent négativement l'activité kinase d'APG1, une protéine essentielle pour l'autophagie, par le biais de la phosphorylation de APG13 qui réduit l'affinité de APG13 pour APG1, ce qui conduit à la répression de l'autophagie (Kamada *et al.*, 2000). Les auteurs ont aussi montré que le contrôle de l'autophagie par les protéines TOR ne fait pas intervenir TAP42, puisque l'accumulation de corps autophagiques vacuolaires en présence de rapamycine est comparable entre des cellules mutantes *tap42* et des cellules sauvages. En plus de contrôler l'induction de l'autophagie, la voie des protéines TOR semble réguler la taille des autophagosomes puisque la rapamycine augmente l'expression du gène *AUT7/APG8*, dont le produit est impliqué dans la formation des autophagosomes (Kirisako *et al.*, 1999 ; Klionsky et Emr, 2000).

En plus de réguler l'autophagie, Les protéines TOR contrôlent la tryptophane perméase TAT2 par le biais de la sérine/thréonine kinase NPR1. En effet, la sur-expression de *NPR1* inhibe la croissance et induit la dégradation de TAT2 alors que la perte de *NPR1* confère une résistance partielle à la rapamycine et à un inhibiteur de transport du tryptophane (Schmidt *et al.*, 1998). De plus, NPR1 est déphosphorylée en présence de rapamycine chez des cellules sauvages, mais pas chez des cellules mutantes pour *TAP42*, ce qui montre que TAP42 est impliqué dans la phosphorylation de NPR1 par les protéines TOR. Enfin, Beck *et al.*, (1999) ont montré que la rapamycine, de même qu'une carence en azote, induit le transport de la tryptophane perméase TAT2 de la membrane plasmique vers la vacuole où elle est dégradée. En inhibant le « turnover » d'une aminoacide perméase, les protéines TOR pourraient assurer une bonne disponibilité en cet aminoacide et contribuer ainsi à la synthèse protéique.

#### 2.2.4 Contrôle des gènes de réponse aux carences et aux stress

TOR1 et TOR2 contrôlent la transcription de gènes induits par la carence en azote en inhibant leur accumulation dans le noyau. Ainsi, les facteurs de transcription GLN3 et GAT1, qui contrôlent l'expression de gènes caractérisés par des motifs GATA au niveau de leur promoteur et codant notamment des enzymes du métabolisme azoté, sont séquestrés dans le cytoplasme en présence d'une source d'azote facilement métabolisable telle que la glutamine. Par contre, une source d'azote difficilement métabolisable, comme la proline, de même qu'un traitement à la rapamycine induisent le transport rapide de GLN3 et GAT1 du cytoplasme vers le noyau, ce qui leur permet d'activer leurs gènes cibles (Beck et Hall, 1999). La séquestration de GLN3 dans le cytoplasme implique la formation d'un complexe avec la protéine URE2, qui est dissocié par la rapamycine, probablement à la suite de la déphosphorylation de GLN3 dépendante de TAP42 et SIT4. D'une manière analogue, TOR1 et TOR2 induisent, via une interaction avec la protéine de type 14-3-3 BMH2, la séquestration dans le cytoplasme des facteurs de transcription MSN2 et MSN4 qui sont responsables de l'expression de gènes induits par le stress (Beck et Hall, 1999). L'importance des protéines de type 14-3-3 a été mise en évidence par le fait que la sur-expression de *BMH1* et *BMH2* confère une résistance à la rapamycine alors que leur délétion conduit à une hypersensibilité (Bertram *et al.*, 1998). De plus, TOR1 et TOR2 contrôlent, par l'inhibition de l'import nucléaire des facteurs de transcription RTG1 et RTG3, la transcription de gènes du cycle de Krebs, qui permettent la synthèse de l' $\alpha$ -cétoglutarate, un précurseur de la glutamine (Komeili *et al.*, 2000). Enfin, le facteur de transcription GCN4 s'ajoute à GLN3 pour contrôler l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation des sources d'azotes difficilement métabolisables en réponse à TOR1 et TOR2 (Valenzuela *et al.*, 2001).

Des travaux récents montrent que GLN3, GAT1 et URE2 ont, dans la voie de signalisation de TOR, un rôle plus large que la seule activation de gènes du métabolisme azoté. En effet, le mutant *ure2Δ* est hypersensible à la perte de eIF4G et à la baisse de l'activité des ARN polymérases I et III induites par la rapamycine, alors que les souches *gln3Δ* et *ure2Δ gln3Δ* y sont partiellement résistantes (Kuruvilla *et al.*, 2001). Ainsi, ces facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique globale par TOR1 et TOR2, comme le confirme le fait qu'une souche *gln3Δ* résiste à la diminution de traduction induite par la proline. De plus, une souche délétée de *GAT1* résiste à la réduction de traduction induite par un passage sur milieu contenant une source de carbone de faible qualité (Kuruvilla *et al.*, 2001). Enfin, plusieurs résultats impliquent GLN3 et GAT1 dans l'activation, induite par TOR1 et TOR2 en réponse au stress salin, de *ENAI*, un gène essentiel à la tolérance au sel, qui code un transporteur de lithium et de sodium (Crespo *et al.*, 2001). D'une part, l'expression de *ENAI* est fortement induite lorsque TOR1 et TOR2 sont inactivés. D'autre part une souche *gat1Δ gln3Δ* est

hypersensible à des concentrations élevées de lithium ou de sodium et a un niveau de transcription de *ENAI* indétectable, même en présence de rapamycine. Enfin, *TOR1* est requis pour la croissance en condition de stress salin. Ainsi, les protéines TOR répondent à des stress variés, qui ne sont probablement pas encore tous identifiés, afin d'assurer que la croissance ne se produise que lorsque les conditions sont favorables.

#### 2.2.5 Contrôle de processus de différenciation

Contrairement à la plupart des souches de *S. cerevisiae* de laboratoire (dont celles qui sont utilisées pour les travaux décrit précédemment) qui sont haploïdes, les souches diploïdes réagissent à une carence en initiant un processus de différenciation méiotique passant par la sporulation. La rapamycine augmente fortement le taux de sporulation de cellules diploïdes à faible efficacité de sporulation soumises à une carence et l'induit en présence de sources riches en carbone et azote chez des cellules à forte efficacité de sporulation (Zheng et Schreiber, 1997). Cependant, l'activité des protéines TOR est nécessaire pour une étape tardive de la méiose puisque la rapamycine diminue le rapport tétrades/dyades. D'autre part, la rapamycine inhibe la différenciation pseudohyphale induite lorsque des cellules diploïdes sont placées sur milieu pauvre en azote (Cutler *et al.*, 2001). Cette croissance filamenteuse qui semble servir à la recherche de nutriments est donc dépendante de la voie de TOR.

#### 2.2.6 Contrôle de l'organisation du cytosquelette

Lors d'un crible de composants de la voie de signalisation unique à TOR2, Schmidt *et al.* (1996) ont isolé le gène *TCP20/CCT6*, qui code une sous-unité d'une chaperonine impliquée dans l'assemblage des structures d'actine, en tant que suppresseur du défaut de croissance induit par la sur-expression d'une version dominante négative de TOR2. De plus, la sur-expression de *TCP20* restaure la viabilité du mutant thermosensible *tor2<sup>ts</sup>* en conditions non permissives, mais ne confère pas de résistance à la rapamycine, ce qui montre que *TCP20* est impliqué dans la fonction unique à TOR2 (Schmidt *et al.*, 1996). Ces résultats ont amené les auteurs à examiner l'organisation du cytosquelette chez *tor2<sup>ts</sup>* et à constater que la perte de TOR2 en conditions non-permissives perturbe l'organisation polarisée du cytosquelette d'actine. Ce phénotype est atténué par la sur-expression de *TCP20/CCT6*. Des analyses génétiques supplémentaires ont permis d'identifier les protéines intervenant dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine par TOR2 (Schmidt *et al.*, 1997). Il s'agit de SAC7, une protéine activatrice de GTPase de type Rho, de RHO1 et RHO2, deux GTPases de type Rho, et de ROM2, un facteur d'échange GDP/GTP associé à RHO1 et RHO2. Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel TOR2

contrôle positivement l'organisation du cytosquelette d'actine en activant RHO1 et RHO2 par le biais de ROM2, alors que SAC7 régule négativement RHO1 et RHO2.

Une fonction commune à TOR1 et TOR2, dans la régulation de l'organisation des microtubules a été mise en évidence récemment (Choi *et al.*, 2000). En effet, des mutants défectueux pour certaines protéines impliquées dans la stabilité et la fonction des microtubules, particulièrement BIK1p (« Bilateral, Karyogamy Defect protein ») sont hypersensibles à la rapamycine. De plus, KIP1p, qui est une protéine associée aux microtubules (MAP, « Microtubule Associated Protein »), interagit avec TOR1 et TOR2. Enfin la rapamycine affecte l'assemblage, l'allongement et la stabilité des microtubules indépendamment de son effet sur la synthèse protéique. La rapamycine induit également des défauts d'orientation du fuseau mitotique, de position du noyau, de caryogamie et de stabilité des chromosomes (Bonatti *et al.*, 1998 ; Choi *et al.*, 2000).

### 2.3 La voie de TOR de *Schizosaccharomyces pombe*

La levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe* possède deux gènes TOR nommés *SpTOR1* et *SpTOR2* (Weisman et Choder, 2001 ; Kawai *et al.*, 2001). *SpTOR2* est un gène essentiel, puisqu'une souche diploïde hétérozygote pour une délétion de *SpTOR2* produit des tétrades avec seulement 1 à 2 spores viables qui portent toutes l'allèle *SpTOR2* (Weisman et Choder, 2001). Par contre, des cellules haploïdes *Ator1* (délétées de *SpTOR1*) ont une croissance identique à celle de cellules sauvages en conditions optimales (Weisman et Choder, 2001 ; Kawai *et al.*, 2001). Cependant, ces cellules ne sont capables ni d'initier l'arrêt en G1 nécessaire au développement sexuel normalement induit par une carence en azote, ni de croître en condition de stress osmotique ou oxydatif. De plus, Cette souche *Ator1* présente des problèmes de prolifération à température élevée (37°C), ce qui suggère que *SpTOR1* est requis pour la réponse à de nombreux stress (Kawai *et al.*, 2001).

La rapamycine n'a pas d'effet sur la croissance végétative de *S. pombe* mais inhibe le développement sexuel au niveau de la conjugaison (Weisman *et al.*, 1997). Ce phénotype induit par la rapamycine ne semble pas dû à l'inhibition de *SpTOR1* ou *SpTOR2* puisqu'il est plus tardif que le défaut de développement sexuel observé chez les cellules *Ator1* et qu'il diffère totalement du phénotype létal des spores *Ator2* (Weisman *et al.*, 1997 ; Weisman et Choder, 2001). L'effet de la rapamycine semble plutôt dû à l'inhibition de la fonction cellulaire du FKBP12 de *S. pombe*, puisque la délétion du gène *fkh1*<sup>+</sup>, codant cette protéine, mime l'effet de la rapamycine (Weisman *et al.*, 2001). Ainsi, la rapamycine ne peut pas être utilisée pour inhiber expérimentalement la voie de TOR chez *S. pombe*. La cause de la résistance des protéines TOR de *S. pombe* à la rapamycine n'est pas encore élucidée et il est difficile de l'attribuer plus



particulièrement aux protéines TOR ou au FKBP12. En effet, si l'expression de *fkh1*<sup>+</sup> chez le mutant *fpr1* de *S. cerevisiae* restaure la sensibilité à la rapamycine, une version de *SpTOR1 pombe* portant une mutation au niveau de son domaine FRB confère la résistance à la rapamycine chez des cellules sauvages de *S. cerevisiae* (Weisman *et al.*, 2001 ; Weisman et Choder, 2001).

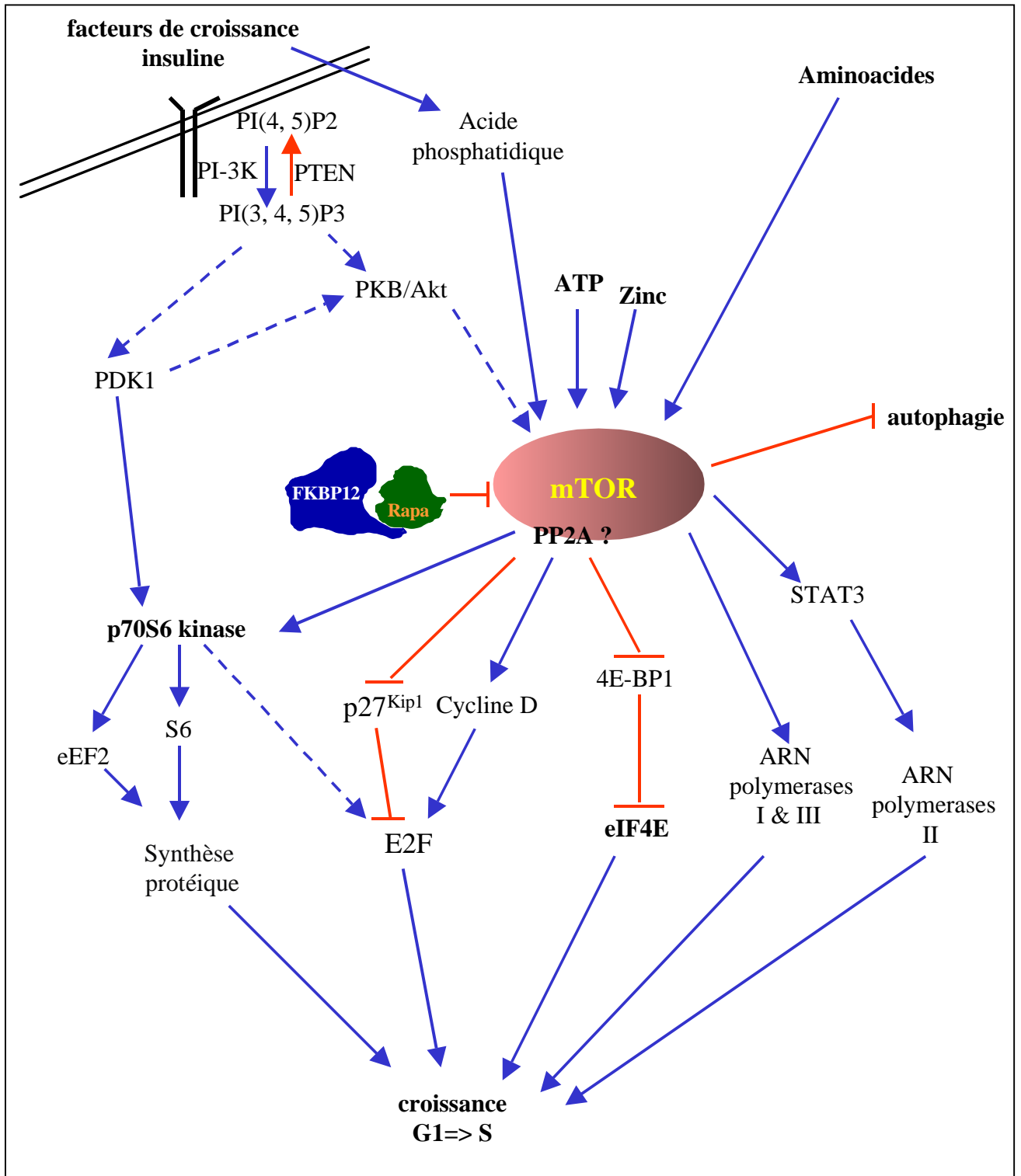
## 2.4 La voie de TOR de mammifères (Fig. 12)

La plupart des travaux tentant d'élucider la voie de TOR chez des cellules de mammifères font appel à des expériences de pharmacologie basées sur l'inhibition spécifique de mTOR par la rapamycine. En effet, les expériences de génétique sont beaucoup plus difficiles à mettre en œuvre chez les animaux que chez les levures et un allèle mutant de mTOR n'a été isolé que très récemment et fortuitement (Hentges *et al.*, 2001).

### 2.4.1 Régulation de la synthèse protéique globale

Les premières recherches sur les cibles de la rapamycine chez les mammifères ont identifié la S6 kinase S6K1 (initialement nommée p70<sup>S6k</sup>), qui phosphoryle la protéine ribosomale S6, comme un élément majeur de la voie de signalisation sensible à la rapamycine. En effet, la rapamycine inhibe l'activation par phosphorylation de la S6K1 induite par l'insuline ou le facteur de croissance épidermique EGF, mais n'affecte pas l'activité des MAP kinases (Chung *et al.*, 1992 ; Price *et al.*, 1992). De plus, l'expression d'une forme résistante à la rapamycine de mTOR protège la S6K1 de l'inhibition par la rapamycine (Brown *et al.*, 1995). Le fait que des souris mutantes pour la S6K1 soient viables, bien que légèrement plus petites, et ne soient pas affectées pour la phosphorylation de la S6, a mené à l'identification d'une deuxième S6 kinase de mammifères appelée S6K2, dont l'activation est également inhibée par la rapamycine (Shima *et al.*, 1998).

Plusieurs résultats soutiennent l'hypothèse que la traduction des ARNm à 5'-TOP (5' tract of oligopyrimidine) serait contrôlée par S6K1. Les ARNm à 5 »-TOP codent des protéines ribosomales ou des facteurs d'élongation de la traduction et ont la particularité de posséder un bloc d'une dizaine de pyrimidines en aval du site de fixation de la coiffe (Meyuhas et Hornstein, 2000). D'une part, ces ARNm sont sélectivement redistribués de la fraction polysomale vers la fraction monosomale des ribosomes lorsque des cellules murines stimulées par du sérum sont traitées à la rapamycine (Jefferies *et al.* 1994). D'autre part, la sur-expression d'une version dominante négative de la S6K1, inhibe la traduction des ARNm à 5'-TOP (Jefferies *et al.*, 1997). Enfin, la traduction des ARNm à 5'-TOP et la phosphorylation de la protéine S6 ne sont pas



**Figure 12 : modèle de la voie de TOR de mammifères.** Les pointillés indiquent des interactions controversées

inhibées par la rapamycine dans des cellules qui expriment une version résistante à la rapamycine de la S6K1 (Jefferies *et al.*, 1997 ; von Manteuffel *et al.*, 1997). Cependant, une étude récente a montré que si la traduction des ARNm à 5'-TOP est rapidement induite par les aminoacides, ni la phosphorylation de S6, ni l'activation de S6K1 ne sont suffisantes pour réactiver la traduction de ces ARNm en condition de carence en aminoacides (Tang *et al.*, 2001). De plus, ces auteurs ont montré, par plusieurs résultats concordants, que la traduction des ARNm à 5'-TOP induite par les aminoacides est en fait indépendante de S6K1 et de la phosphorylation de S6, qu'elle n'est inhibée que partiellement et tardivement par la rapamycine, mais qu'elle est par contre activée par la voie des PI3-K (faisant intervenir PI3-K, PTEN et PKB indépendamment de mTOR).

Ainsi, la fonction des S6K est encore mal connue mais leur capacité à phosphoryler la protéine ribosomale S6 suggère fortement qu'elles ont un rôle dans la biosynthèse des ribosomes. Le rôle de la protéine S6 a été étudié par délétion conditionnelle dans le foie de souris adultes (Volarevic *et al.*, 2000). Des foies dans lesquels une délétion de S6 a été effectuée sont incapables de se régénérer après une ablation partielle ce qui s'explique par un rôle de S6 dans la biosynthèse des ribosomes nécessaire à la croissance couplée à la prolifération. Par contre, les cellules de ces foies sont capables de recroître lorsque la nourriture est apportée après une diète suffisamment longue pour entraîner une diminution de 50 % de la taille des cellules et de leur contenu en ribosomes, ce qui montre que S6 n'est pas nécessaire à ce type de synthèse ribosomale. À ce propos, d'autres types de croissance cellulaire, par différenciation, pourraient ne pas nécessiter mTOR. En effet la croissance des neurites est favorisée par la rapamycine plutôt que d'être inhibée, comme on aurait pu s'y attendre si cette croissance avait nécessité mTOR (Parker *et al.*, 2000).

Le contrôle de la synthèse protéique par mTOR implique aussi le facteur eucaryotique d'élongation de la traduction eEF2. En effet, la rapamycine inhibe la déphosphorylation de eEF2 induite par l'insuline dans des cellules d'ovaires de hamster exprimant le récepteur humain à l'insuline (Redpath *et al.*, 1996). Cette régulation fait intervenir S6K1 qui inhibe l'activité d'une kinase capable d'inactiver eEF2 par phosphorylation (Wang *et al.*, 2001).

#### 2.4.2 Régulation de la transcription

La transcription des ARN ribosomaux (ARNr) est aussi sous le contrôle de mTOR, puisqu'elle est inhibée par la rapamycine (Mahajan, 1994). De plus, l'activité des ARN polymérases I et III est inhibée par la protéine du rétinoblastome qui est elle même régulée par mTOR (voire sous-chapitre 1.4.4 ; White, 1997). Ces deux types d'activation de la transcription

par mTOR aboutissent à une augmentation de la synthèse protéique par la production d'ARN ribosomaux et d'ARN de transfert.

mTOR contrôle l'activité de l'ARN polymérase II par le biais de l'activateur de transcription STAT3 (« Signal Transducers and Activators of Transcription ») (Yokogami *et al.*, 2000). En effet, la rapamycine inhibe la phosphorylation de STAT3 induite par la cytokine CNTF (« Ciliary Neurotrophic Factor ») au niveau de la Sérine 727 dont la phosphorylation est importante pour l'activation de STAT3. De plus, après immunoprécipitation, mTOR est capable de phosphoryler STAT3 au niveau de cette sérine. Ainsi, mTOR contrôle, au moins dans certains tissus, la transcription en plus de la traduction.

#### 2.4.3 Contrôle de l'initiation de la traduction

Le facteur eucaryotique d'initiation de la traduction eIF4E a pour rôle de fixer le complexe d'initiation de la traduction à la coiffe des ARNm. Il favorise particulièrement la traduction des ARNm dont la partie 5' non traduite est fortement structurée, comme les transcrits codants l'ornithine decarboxylase, l'oncogène c-myc, et la cycline D est particulièrement dépendante de eIF4E (Koromilas *et al.*, 1992 ; West *et al.*, 1998). La protéine 4E-BP1 (eIF4E Binding Protein 1) régule négativement la traduction dépendante de la coiffe en entrant en compétition avec eIF4G pour la fixation de eIF4E et en empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F (Fig. 11 ; Gingras *et al.*, 2001). Plusieurs travaux ont montré que mTOR régule positivement la traduction des ARNm coiffés par le biais de la phosphorylation de 4E-BP1. D'une part, l'insuline favorise la libération de eIF4E en induisant la phosphorylation de 4E-BP1 par un mécanisme inhibé par la rapamycine (Beretta *et al.*, 1996 ; Von Manteuffel *et al.*, 1996). D'autre part, mTOR immunoprécipitée est capable de phosphoryler 4E-BP1 (Brunn *et al.* 1997). Enfin, l'expression d'une forme résistante à la rapamycine de mTOR permet à la phosphorylation de 4E-BP1, dépendante des mitogènes, d'avoir lieu en présence de rapamycine, alors que la sur-expression d'une forme inactive de mTOR bloque la phosphorylation de 4E-BP1 (Brunn *et al.* 1997 ; Hara *et al.*, 1997). Kumar *et al.* (2000) ont montré que la protéine kinase PKC $\delta$ , qui interagit avec mTOR, est requise pour la phosphorylation de 4E-BP1 et pour l'activation de la traduction dépendante de la coiffe. De plus, l'un des sites de phosphorylation de PKC $\delta$  est sous le contrôle de mTOR (Ziegler *et al.*, 1999 ; Parekh *et al.*, 1999). Les PKCs étant impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, il est possible que l'activation de PKC $\delta$  par mTOR ait d'autres conséquences que l'inhibition de 4E-BP1.

Il a été montré récemment que la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 au niveau de 3 sérines, en réponse à des mitogènes ou à un traitement au sérum, est

inhibée par la rapamycine (Raught *et al.* 2000). Cela représente une seconde voie par laquelle mTOR active le complexe eIF4F et de la traduction des ARNm fortement structurés en 5'.

#### 2.4.4 Implication d'une protéine phosphatase dans la voie de signalisation de mTOR

Des expériences menées *in vitro* ont montré que mTOR purifié par immunoprécipitation contient une activité kinase capable de phosphoryler S6K1 et, dans une moindre mesure, 4E-BP1, au niveau de sites qui sont phosphorylés *in vivo* (Brunn *et al.*, 1997 ; Burnett *et al.*, 1998 ; Nishiuma *et al.*, 1998 ; Isotani *et al.*, 1999). Cependant, cette activité kinase peut faire intervenir des protéines interagissant avec mTOR, comme nous l'avons vu pour PKC $\delta$ , plutôt que d'être propre à mTOR. De plus, la pertinence *in vivo* de ces résultats obtenus *in vitro* reste à démontrer. Ainsi, d'autres études indiquent que mTOR active 4E-BP1 et S6K1 par le biais de l'inactivation de PP2A, une protéine phosphatase (PP) qui peut interagir avec  $\alpha 4$ , l'homologue de Tap42 de levure. D'une part, PP2A co-précipite avec S6K1 mais ne peut pas s'associer à la forme résistante à la rapamycine de S6K1 (Westphal *et al.*, 1999 ; Peterson *et al.*, 1999). D'autre part, la calyculine A, un inhibiteur de phosphatases interfère avec la déphosphorylation de 4E-BP1 et S6K1 induite par la rapamycine (Peterson *et al.*, 1999). De plus, des cellules lymphoïdiques sur-exprimant  $\alpha 4$  sont partiellement résistantes à la rapamycine (Inui *et al.*, 1998). Enfin, Il semblerait, bien que cela soit sujet à controverse, que la rapamycine inhibe l'association de la sous-unité catalytique de PP2A avec  $\alpha 4$  (Murata *et al.*, 1997 ; Inui *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1998). Ainsi, mTOR semble contrôler la phosphorylation de ces cibles en inhibant l'activité d'une protéine phosphatase via l'induction de la fixation de  $\alpha 4$  à cette phosphatase. La nature exacte de la phosphatase inhibée par mTOR reste à élucider car la calyculine A est un inhibiteur de phosphatases peu spécifique qui inhibe à la fois PP2A et PP1, et des inhibiteurs plus spécifiques de PP2A ou PP1 ne bloquent pas l'inhibition de la S6K1 (Parott et Templeton, 1999). Cependant, l'hypothèse d'une interaction entre PP2A et mTOR est confortée par le fait que ces deux protéines possèdent des motifs répétés HEAT qui sont impliqués dans des interactions protéine-protéine (Andrade et Bork, 1995).

#### 2.4.5 Contrôle du cycle cellulaire

Plusieurs travaux mettent en évidence le rôle de p27<sup>Kip1</sup>, un inhibiteur de CDKs (kinase dépendante d'une cycline), dans le contrôle par mTOR de la progression des phases G1 à S du cycle cellulaire. En effet, la rapamycine inhibe la baisse de la quantité de protéines p27<sup>Kip1</sup> et l'activation de CDK2, une CDK associée à la cycline E induites par l'interleukine 2 ou par du sérum (Nourse *et al.*, 1994 ; Morice *et al.*, 1993 ; Jayaraman et Marks, 1993 ; Kawamata *et al.*,

1998). Deux lignées cellulaires murines résistantes à la rapamycine ont été obtenues par incubation prolongée avec de la rapamycine (Luo *et al.*, 1996). Curieusement, ces cellules ne portent pas de mutation au sein de FKBP12 ou du domaine FRB de mTOR et ont une réponse normale à la rapamycine au niveau de la déphosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 (Luo *et al.*, 1996 ; Marx et Marks, 1999). Par contre, ces cellules présentent constitutivement un taux faible de p27<sup>Kip1</sup> et une forte phosphorylation de pRb qui ne sont modifiés ni par le sérum ni par la rapamycine (Luo *et al.*, 1996). De plus, la délétion de *p27<sup>Kip1</sup>*, ainsi que l'expression d'un ADNc anti-sens de *p27<sup>Kip1</sup>*, conduisent à une hypo-sensibilité à la rapamycine (Luo *et al.*, 1996 ; Kawamata *et al.*, 1998). Ces résultats confirment le rôle important de la régulation négative de p27<sup>Kip1</sup> dans la voie de signalisation de mTOR.

La voie de mTOR contrôle aussi le cycle cellulaire par le biais de la cycline D1 puisque la rapamycine diminue à la fois le taux d'ARNm de la cycline D1 et la stabilité de la protéine (Hashemolhosseini *et al.*, 1998). Cet effet de la rapamycine est associé à une augmentation de l'association de p27<sup>Kip1</sup> avec le complexe cycline E-CDK2, mais aussi à une diminution de l'association de p27<sup>Kip1</sup> avec le complexe cycline D1-CDK4. Ces effets opposés de la rapamycine sur l'interaction entre p27<sup>Kip1</sup> et ces deux complexes Cyclin-CDK ont tous deux une conséquence négative sur la progression des phases G1 à S du cycle cellulaire. En effet, si p27<sup>Kip1</sup> ne semble pas inhiber significativement l'activité du complexe cycline D-CDK4, la séquestration des inhibiteurs de CDK tels que p27<sup>Kip1</sup> par ce complexe diminue leur capacité à inhiber le complexe cycline E-CDK2 et contribue ainsi à la phosphorylation de pRb et à l'inhibition de la répression de E2F (Sherr et Roberts, 1999).

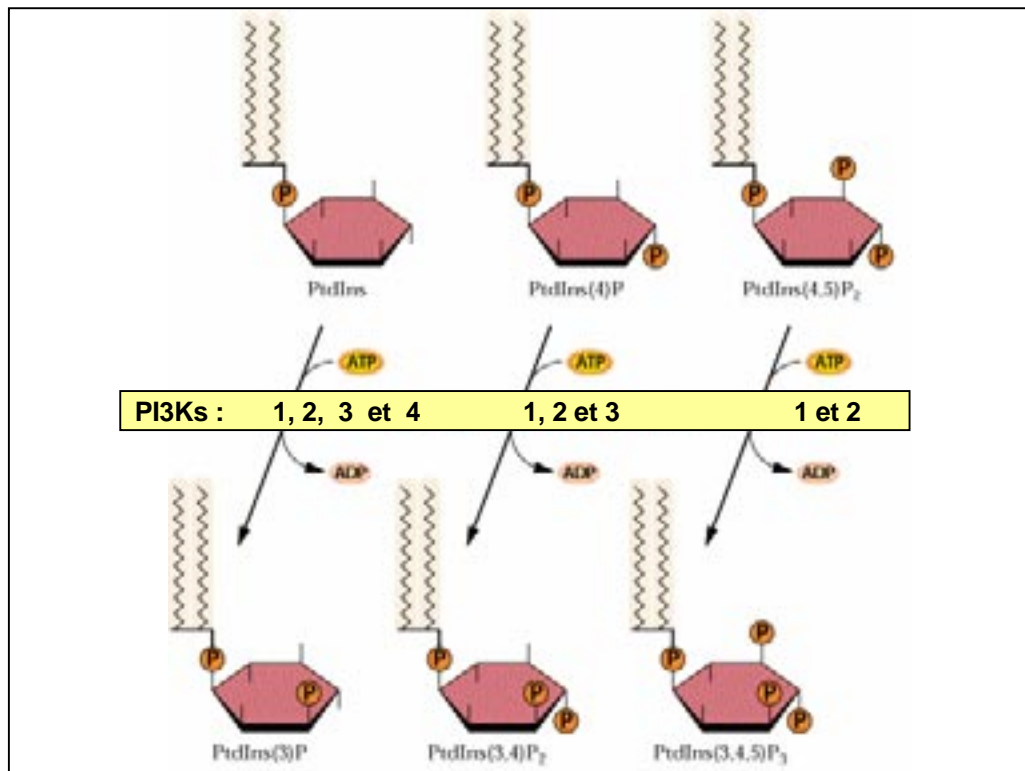
Enfin, mTOR régule aussi l'activité de E2F par l'intermédiaire de S6K1. En effet, Brennan *et al.* (1999) ont montré, en suivant l'activité d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des sites de fixation de E2F, que la rapamycine inhibe la transcription dépendante de E2F, et que cette inhibition n'est pas observée lorsque les cellules expriment une forme résistante à la rapamycine de S6K1. Cependant, cette S6K1 modifiée ne suffit pas à restaurer l'inhibition du cycle cellulaire induite par la rapamycine, ce qui est cohérent avec l'idée que d'autres effecteurs de la voie de mTOR tels que p27<sup>Kip1</sup> et la cycline D, mais aussi eIF4F, agissent en synergie avec S6K1 pour activer la progression de la phase G1 à S du cycle cellulaire (Brennan *et al.*, 1999).

#### 2.4.6 Activation de mTOR par l'insuline et les facteurs de croissance

L'une des voies majeures de contrôle de la croissance cellulaire des animaux est la voie de signalisation des facteurs de croissance de type insuline (IGF, « Insulin-like Growth Factors » ; Prober et Edgar, 2001). La fixation des IGFs à leurs récepteurs permet l'activation de

phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) de classe I et II qui sont capables de phosphoryler le phosphatidylinositol (PI) en position D3 (Fig. 13). Cela génère du PI (3, 4, 5) P3, un second messager qui induit une voie de signalisation menant à l'activation de protéines impliquées dans la croissance cellulaire. L'une de ces protéines, PDK1 (Phosphatidylinositol dependent kinase) participe à l'activation de S6K1 par phosphorylation. PTEN (« phosphatase and tensin homologue ») est une lipide-phosphatase qui régule négativement cette voie de signalisation par son activité antagoniste de celle des PI3K (Prober et Edgar, 2001). Le rôle des PIKs dans la croissance des mammifères a été mis en évidence par l'observation que l'expression constitutive d'une PI3K active conduit à des souris à grand cœur, alors qu'une PI3K dominante négative réduit la taille de cet organe (Shioi *et al.*, 2000).

Le fait que la phosphorylation de S6K1 et de 4E-BP1 induite par l'insuline et d'autres facteurs de croissance, soient sensibles à la wortmannine, un inhibiteur des PI3-K, suggère fortement que l'activation de ces protéines par mTOR est contrôlée par les PI3-K (Cheatham *et al.*, 1994, Chung *et al.*, 1994 ; Beretta *et al.*, 1996 ; von Manteuffel *et al.*, 1996). Cependant, les expériences utilisant la wortmannine doivent être considérées avec précaution puisqu'elle n'est pas aussi spécifique que la rapamycine et qu'elle est capable d'inhiber certaines kinases apparentées aux PI3K, comme ATM (Sarkaria *et al.*, 1998). De plus, Brunn *et al.* (1996) ont montré que l'activité autokinase de mTOR est elle même directement inhibée *in vitro* par la wortmannine. Néanmoins, l'activité autokinase de mTOR n'est pas associée à l'activation de S6K1 et 4E-BP1 ce qui suggère que son inhibition par la wortmannine n'est pas représentative de l'inhibition de la fonction *in vivo* de mTOR (Peterson *et al.*, 2000). D'autres travaux portant sur l'activation de 4E-BP1 dans des cellules embryonnaires surexprimant soit la sous-unité catalytique p110, une PI3-K de type I, soit la protéine kinase B (PKB/Akt) qui est située en aval des PI3-K, ont permis d'établir l'appartenance de mTOR à la voie des PI3-K (Gingras *et al.*, 1996). Ainsi, alors que la sur-expression de p110 active la phosphorylation de 4E-BP1 d'une manière sensible à la rapamycine et à la wortmannine, la sur-expression d'une version résistante à la wortmannine de Akt/PKB active la phosphorylation de 4E-BP1 d'une manière sensible à la rapamycine mais résistante à la wortmannine. De plus, les auteurs ont montré que Akt/PKB n'est pas capable de phosphoryler directement 4E-BP1 *in vitro*, et que l'activation de 4E-BP1 par Akt/PKB passe par mTOR puisqu'elle n'est pas inhibée par la rapamycine en présence de la forme résistante à la rapamycine de mTOR (Gingras *et al.*, 1996). D'autre part, il a été montré que la sur-expression de formes recombinantes activées de Akt/PKB est capable d'induire la phosphorylation de mTOR ainsi que celle de 4E-BP1 par mTOR immunoprécipitée (Navé *et al.*, 1999 ; Scott *et al.*, 1998). Cependant, ces derniers résultats restent discutables du fait de l'incertitude sur le lien entre l'activité *in vivo* de mTOR et sa phosphorylation ou son activité 4E-BP1-kinase.



**Figure 13 : réactions enzymatiques catalysées par les différentes classes de phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K).** Dans le cadre jaune, sont indiquées les classes de PI3Ks capables de phosphoryler ces différents types de PtdIns. PtdIns : phosphatidylinositol.



Une étude récente a montré que mTOR est activé par l'acide phosphatidique, un second messager lipidique impliqué dans de nombreuses signalisations intracellulaires dont l'action mitogène de facteurs de croissance et d'hormones (Fang *et al.*, 2001). L'acide phosphatidique induit l'activation de S6K1 et de 4E-BP1 en absence de sérum, d'une manière sensible à la rapamycine. De plus, l'activation de S6K1 et 4E-BP1 par le sérum est abolie par des inhibiteurs de la production d'acide phosphatidique. Enfin, l'acide phosphatidique interagit directement avec le domaine FRB de mTOR. Le résidu Arg<sup>2109</sup> est particulièrement important pour cette interaction et sa mutation en Ala diminue l'activation, par le sérum, d'une protéine mTOR recombinante. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une activation directe de mTOR par l'acide phosphatidique qui agirait en parallèle de la voie des PI3-K lors de l'activation de mTOR par les agents mitogènes (Fang *et al.*, 2001).

#### 2.4.7 Stimulation de mTOR par les aminoacides

Les cellules animales ne produisent pas tous les aminoacides dont elles ont besoin. Ces aminoacides doivent donc être apportés par une source externe (via l'alimentation), ce qui rend possible les carences directes en aminoacides. La première indication de l'activation de la voie de mTOR par les aminoacides vient d'expériences sur des hépatocytes de rat. L'addition d'aminoacides conduit à une rapide stimulation de la phosphorylation de la protéine S6 et à une inhibition de l'autophagie d'une manière sensible à la rapamycine (Blommart *et al.*, 1995). Des études complémentaires menées sur des cellules d'ovaires de hamster et des hépatocytes ont montré que le transfert d'un milieu riche dans un milieu dépourvu en aminoacides induit une diminution de la phosphorylation et de l'activité kinase de S6K1, associée à la déphosphorylation de 4E-BP1, à une augmentation de la fixation de 4E-BP1 à eIF4E, à la dissociation du complexe eIF4F et à la phosphorylation de eEF2 (Wang *et al.*, 1998 ; Patti *et al.*, 1998 ; Hara *et al.*, 1998 ; Kimball *et al.*, 1999). Ces effets de la carence en aminoacides sont rapidement réversibles par ré-addition d'aminoacides, d'une manière sensible à la rapamycine (Wang *et al.*, 1998 ; Patti *et al.*, 1998 ; Hara *et al.*, 1998 ; Kimball *et al.*, 1999). L'implication de mTOR dans cette voie de signalisation par les aminoacides a été confirmée par le fait que, chez des cellules exprimant une forme résistante à la rapamycine de mTOR (mutée au niveau de la Ser2035), l'addition d'aminoacides induit la phosphorylation de S6K1 en présence de rapamycine (Iiboshi *et al.*, 1999a). De plus, une S6K1 mutante résistante à la rapamycine reste active lors d'une carence en aminoacides (Hara *et al.*, 1998). Enfin, cette réponse aux aminoacides semble propre à mTOR et ne semble pas utiliser la voie des PI-3kinases ou des MAP (mitogen associated protein) kinases puisque la disponibilité en aminoacides n'affecte pas

les autres protéines de signalisation testées, dont Akt/PKB, Cdk2, les PI-3 kinases et les MAP kinases (Wang *et al.*, 1998 ; Hara *et al.*, 1998 ; Iiboshi *et al.*, 1999a).

Les travaux décrits précédemment, ainsi que d'autres menés sur des adipocytes de rats et des myoblastes, ont montré que la L-leucine est le principal aminoacide responsable de l'activation de la voie de mTOR (Wang *et al.*, 1998 ; Patti *et al.*, 1998 ; Fox *et al.*, 1998, Lynch *et al.*, 2000 ; Kimball *et al.*, 1999). Cependant, les autres aminoacides sont nécessaires pour obtenir une activation maximale. D'autre part, une carence en L-aspartate et L-glutamate, obtenue par un traitement à la L-Asparaginase, est suffisante pour induire l'inactivation de S6K1 dans des cellules leucémiques (Iiboshi *et al.*, 1999b).

Iiboshi *et al.* (1999a) ont proposé, à partir de plusieurs expériences portant sur des cellules lymphoblastoïdes de type T, un mécanisme par lequel les aminoacides contrôlent la voie de mTOR. Premièrement, les aminoacides alcools, qui ont la propriété d'inhiber l'aminacylation des ARNt en entrant en compétition avec les aminoacides au niveau des aminoacyl-ARNt synthétases, inhibent la S6K1. Deuxièmement, l'inactivation de la S6K1 par une carence en aminoacides est bloquée par des inhibiteurs de l'utilisation des ARNt aminoacylés. Enfin, la S6K1 est inhibée lorsque des cellules portant une histidyl-ARNt synthétase mutante thermo-sensible sont passées à une température non-permissive. Ainsi, l'inhibition de l'aminacylation des ARNt est capable d'inactiver S6K1, et mTOR pourraient détecter une carence en aminoacides par la présence d'ARNt non aminoacylés (Iiboshi *et al.*, 1999a). Les auteurs ne pensent pas que mTOR interagisse directement avec les ARNt, puisque mTOR n'a pas de séquence homologue aux aminoacyl-ARNt synthétases (contrairement à la protéine de levure GCN2 qui perçoit les ARNt au niveau d'un domaine homologue aux aminoacyl-ARNt synthétases) et qu'un mélange d'ARNt n'est pas capable d'inhiber l'activité de mTOR *in vitro*. Cependant, ce modèle ne s'applique pas à tous les types cellulaires, puisque sur des adipocytes, la phosphorylation de 4E-BP1 n'est pas affectée par le leucinol alors qu'elle est fortement inhibée par une carence en leucine (Lynch *et al.*, 2000).

Ainsi, plusieurs études ont montré que, en plus d'être activée par l'insuline et les facteurs de croissance (mitogènes), mTOR joue un rôle de « senseur » de la disponibilité en aminoacides. L'activation de mTOR n'a pas lieu lorsque les mitogènes (ou l'acide phosphatidique) sont ajoutés sans aminoacides, et vice-versa, ce qui montre que la combinaison de ces deux stimuli est nécessaire (Fang *et al.*, 2001). Il semble que mTOR active les mêmes cibles en réponse à ces deux stimuli et qu'il soit donc leur point de convergence.

#### 2.4.8 Autres modes de contrôle de mTOR

Bien que les deux principaux modes de contrôle de mTOR identifiés jusqu'à présent soient la disponibilité en aminoacides et la voie de l'insuline, d'autres facteurs agissant en amont de mTOR ont été décrits.

D'une part, la phénanthroline, un chelateur de métaux, inhibe la phosphorylation de S6K1 induite par les aminoacides et l'insuline, alors que l'ajout de zinc l'augmente (lynch *et al.*, 2001). De plus, l'ajout de zinc augmente de 2 à 5 fois l'activité d'une protéine mTOR immunoprécipitée et est aussi capable de stimuler une version recombinante de mTOR *in vitro*. Le zinc semble donc activer directement mTOR, ce qui n'est pas très surprenant puisqu'il s'agit d'un élément essentiel à la croissance et nécessaire pour la structure et l'activation de nombreuses protéines.

D'autre part, certains inhibiteurs de la production d'ATP inhibent l'activation de 4E-BP1 et S6K1 par mTOR (Dennis *et al.*, 2001). De plus, l'activité de mTOR requiert une concentration particulièrement élevée en ATP puisque la constante de Michaelis de mTOR pour l'ATP est 50 à 100 fois plus élevée que celle des autres kinases. Cela pourrait s'expliquer par une structure particulière de la poche de fixation de l'ATP située au niveau du domaine kinase de mTOR. Ainsi, les auteurs ont proposé l'hypothèse que mTOR serait un senseur de la concentration d'ATP intracellulaire.

Enfin, il a été proposé que mTOR soit régulé au niveau de sa localisation ou de la disponibilité en substrat plutôt qu'au niveau de son état de phosphorylation (Peterson *et al.*, 2000). L'implication du changement de localisation intracellulaire de mTOR dans son activité a été mise en évidence par Kim et Chen (2000) qui ont montré que la leptomycine B, un inhibiteur de la machinerie d'exportation du noyau, induit l'accumulation de mTOR et de S6K1, mais pas de 4E-BP1, dans le noyau. De plus, la leptomycine B bloque l'activation de S6K1 et 4E-BP1 par l'insuline, ce qui suggère que mTOR doit passer par le noyau afin d'acquérir la capacité d'activer ses cibles dans le cytoplasme. Cela est confirmé par le fait que la transformation de cellules embryonnaires avec mTOR fusionnée à un peptide signal nucléaire d'exportation ou d'importation, conduisent respectivement à l'inactivation ou à l'activation de S6K1 et de 4E-BP1 (Kim et Chen, 2000).

#### 2.4.9 Confirmations *in vivo* de l'importance de la voie de mTOR

Un mutant de *mTOR*, mourant prématurément au cours du développement embryonnaire, a été identifié récemment à partir d'un crible de souris présentant un défaut de développement du télencéphale (Hentges *et al.*, 1999 ; Hentges *et al.*, 2001). Il s'agit d'une mutation ponctuelle au

niveau d'un intron qui conduit à un défaut d'épissage et à la formation d'au moins quatre ARNm : l'ARN sauvage en quantité minoritaire, un ARNm codant une protéine tronquée, et deux ARNm codant des protéines de taille normale mais portant une modification dans la partie N-terminale. Ces deux dernières protéines ont une activité 4E-BP1-kinase très réduite par rapport à mTOR sauvage lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules en culture. De plus, la S6 kinase des embryons mutants est moins phosphorylée et présente une activité S6 kinase réduite correspondant 17% de l'activité chez le sauvage, ce qui révèle une forte inactivation de la voie de mTOR. Les auteurs ont aussi montré que les cellules de l'embryon mutant ont une taille normale, mais sont moins nombreuses que chez le sauvage (Hentges *et al.*, 2001).

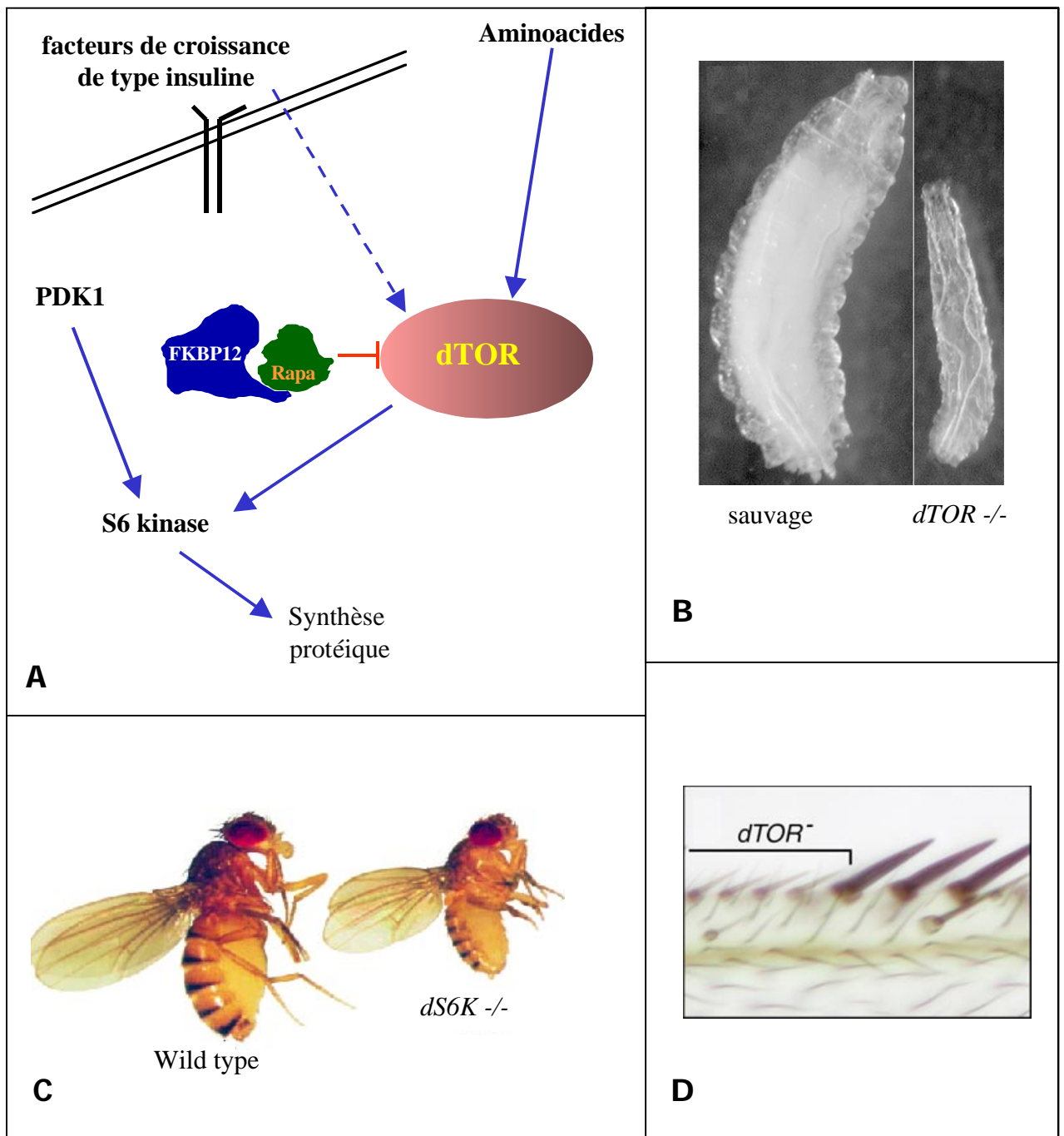
D'autres résultats obtenus *in vivo* corroborent le rôle de mTOR observé *in vitro* sur des cultures cellulaires. En effet, la rapamycine inhibe l'hypertrophie musculaire induite par l'application d'une charge de travail chronique à un muscle du squelette (Bodine *et al.*, 2001). De même, la rapamycine bloque la croissance musculaire observée lorsque des rats, qui ont été suspendus suffisamment longtemps pour induire une atrophie des muscles des pattes arrières causée par l'absence de travail, sont replacés au sol et recouvrent leur masse musculaire en marchant. Ces deux modèles de croissance musculaire sont associés à une activation de S6K1 et une inhibition de l'interaction entre 4E-BP1 et eIF4E, toutes deux sensibles à la rapamycine. Par contre, la rapamycine n'induit pas de perte de masse musculaire chez des rats adultes ce qui montre que mTOR n'est pas impliqué dans le maintien de la masse musculaire. Le lien avec Akt a été montré par le fait que la sur-expression d'une version hyperactive de Akt est capable d'induire l'hypertrophie d'une manière dépendante de la rapamycine (Bodine *et al.*, 2001).

Enfin, certains travaux ont mis en évidence l'activation de la voie de mTOR par les aminoacides dans les muscles et le foie, ce qui souligne son importance physiologique (Shah *et al.* 2000).

Le transcrit de *mTOR* est détectable par transfert de Northern dans tous les organes de mammifères (Brown *et al.*, 1994 ; Chiu *et al.*, 1994) Il a été également détecté par hybridation *in situ* dans tous les tissus, à l'exception du cœur, chez un embryon de souris (Hentges *et al.*, 2001). Cependant, même si cela a été très peu étudié, l'expression de mTOR pourrait être régulée post-transcriptionnellement.

## **2.5 Analyse génétique de la voie de TOR de drosophile (Fig. 14)**

Plusieurs allèles mutants de l'unique gène *TOR* de *Drosophila melanogaster* (*dTOR*) ont été isolés à partir d'une banque de mutants d'insertion de transposons et d'une mutagenèse chimique (Oldham *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2000). Des homozygotes pour un allèle nul de



**Figure 14 : la voie de TOR de drosophile.** **A**, modèle de la voie de dTOR. **B**, comparaison d'une larve sauvage et d'une mutante *dTOR*<sup>-/-</sup> à 126 h de développement. **C**, comparaison d'une drosophile sauvage et d'une mutante *dS6K*<sup>-/-</sup> 4 jours après éclosion. **D**, clone de cellules mutantes pour un allèle nul de *dTOR*<sup>-</sup> obtenu par recombinaison mitotique au sein d'une drosophile hétérozygote *dTOR*<sup>+/-</sup>. **B** et **D** sont tirées de Zhang *et al.* (2000). **C** est tirée de Montagne, *et al.* (1999).

*dTOR* éclosent normalement mais grandissent plus lentement que des sauvages et s'arrêtent souvent au stade larvaire, alors que des hétérozygotes grandissent normalement bien qu'ils soient hypersensibles à la rapamycine (Zhang *et al.*, 2000). Des cellules homozygotes pour un allèle nul de *dTOR* ont pu être générées par recombinaison mitotique au sein de l'hétérozygote. Des cellules d'aile adulte mutantes ainsi obtenues survivent mais sont environ deux fois plus petites que les autres cellules de l'hétérozygote utilisées comme contrôle (Zhang *et al.*, 2000). La perte de *dTOR* conduit également à une réduction cellule-autonome de 30% de la taille des cellules prolifératrices des disques imaginaux, et à une augmentation du nombre de cellules en G1 (en accord avec l'effet de la rapamycine). *dTOR* est aussi requis pour l'endoréplication puisque des cellules endoréplicatives de glandes salivaires *dTOR*- ont un noyau réduit qui ne dépasse pas une ploidie de 16C alors que des sauvages atteignent 2048C (Oldham *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2000).

Zhang *et al.* (2000) ont ensuite étudié un lien possible entre dTOR et la voie de signalisation de l'insuline. Alors que des cellules mutantes pour *dPTEN* sont agrandies, des cellules *dPTEN*-/*dTOR*- ne sont pas distinguables des cellules *dTOR*-, ce qui montre que *dTOR* - est épistatique sur *dPTEN* -. D'autre part, la rapamycine inhibe la phosphorylation de la p70<sup>S6k</sup> de drosophile (dS6K) d'une manière dépendante de dTOR et la surexpression d'une version constitutivement active de S6K1 humaine est capable de restaurer la viabilité de mutants non nuls de *dTOR*, ce qui suggère que dS6K est un effecteur de dTOR (Stewart *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2000). La fonction de *dS6K* dans la croissance cellulaire a été mise en évidence par l'identification de mutants (Montagne *et al.*, 1999). Les rares mutants homozygotes pour un allèle nul de *dS6K* qui passent le stade larvaire ont un important retard de développement, sont presque deux fois plus petites que les drosophiles sauvages, et meurent rapidement. Leur petite taille s'explique par une plus petite taille des cellules plutôt que par un plus faible nombre de cellules. Cette différence de phénotype avec les mutants *Minutes* (chapitre 1.5), chez lesquels la traduction est globalement réduite, pourrait s'expliquer par la traduction préférentielle des ARNm de protéines non-ribosomales, notamment un régulateur du cycle cellulaire, dans les cellules délétées de dS6K (Thomas, 2000). Ainsi, dans un contexte sauvage, dS6K empêcherait l'accumulation de ce régulateur du cycle cellulaire jusqu'à ce que la cellule atteigne une taille appropriée. L'induction, par recombinaison mitotique, de cellules homozygotes mutantes de petite taille au sein d'un individu hétérozygote a montré que *dS6K* contrôle la taille cellulaire d'une manière cellule-autonome (Montagne *et al.*, 1999). Une implication de dTOR dans la signalisation par les nutriments a été proposée suite à l'observation que la perte de *dTOR* mime les effets d'une carence en aminoacides au niveau de plusieurs critères : la réduction de la taille du nucléole, l'agrégation de vésicules lipidiques et l'arrêt de la synthèse d'ADN chez des cellules endoréplicatives (Zhang *et al.*, 2000). Enfin, ces auteurs ont montré que la sur-

expression de la cycline E permet d'aller au delà de l'arrêt du cycle cellulaire causé par la perte de *dTOR* et que l'expression de cette cycline est réduite chez des mutants *dTOR*-.

Radimerski *et al.* (2002) ont récemment montré que, dans des cellules d'embryon de drosophile en culture, une carence en aminoacides bloque la phosphorylation induite par l'insuline de dS6K mais pas de dPKB. De plus, l'activité dPKB mais pas celle de dS6k est abolie dans un mutant nul pour une sous-unité de PI3K, alors que c'est l'inverse dans des mutants *dPDK1*. L'activation de la S6kinase par dTOR et PDK1, dépendante du récepteur à l'insuline, pourrait donc être indépendante de PKB et PI3K, ce qui va à l'encontre du modèle proposé chez les mammifères (Fig. 12). L'acide phosphatidique, qui transmet le signal d'activation de mTOR par les mitogènes chez les mammifères, pourrait être impliqué dans cette activation (Fang *et al.*, 2001).

Ainsi, dTOR régule la croissance au cours du développement de la drosophile en faisant le lien entre la signalisation par les facteurs de croissance et la disponibilité en nutriments. Cette voie de signalisation paraît bien conservée entre la drosophile et les mammifères.

## **2.6 Conservation de la voie de TOR chez les levures et les animaux**

Certains éléments conservés ressortent de la description de nos connaissances actuelles des voies de signalisation des protéines TOR de levures et d'animaux.

D'une part, chez tous ces organismes, les protéines TOR ont un rôle essentiel comme le révèlent les phénotypes dramatiques des mutants ou l'effet de la rapamycine. L'inhibition du cycle cellulaire induite par l'inactivation de TOR est commune à *S. cerevisiae* et aux animaux. Bien que ce ne soit pas encore démontré chez *S. pombe*, il y a de grandes chances pour qu'un phénomène semblable soit à l'origine de la létalité des mutants *Ator2*.

D'autre part, le contrôle de la synthèse protéique par TOR est conservé des levures aux mammifères au niveau de l'activité des ARN polymérases I et III et du complexe d'initiation de la traduction eIF4F. Par contre, il ne semble pas qu'il y ait de contrôle de la phosphorylation de la protéine S6 par TOR chez *S. cerevisiae* puisqu'aucun homologue de S6K1 n'a encore été identifié chez cette levure (Powers et Walter, 1999). De plus, bien que l'équivalent de levure de la protéine S6 soit normalement phosphorylé parallèlement à la croissance cellulaire, aucun défaut de croissance n'est observé lorsque ces sites de phosphorylation sont mutés (Johnson and Warner, 1987). Ainsi, les protéines TOR contrôlent la synthèse protéique globale et la traduction préférentielle de certains ARNm chez tous ces eucaryotes, mais la manière d'y parvenir varie d'un organisme à l'autre.

De plus, le contrôle de l'autophagie par les protéines TOR est conservé entre les levures et animaux. Cela s'explique par l'importance de ce phénomène pour la survie en conditions de carence.

Enfin, les protéines TOR font le lien entre l'état nutritif et la croissance cellulaire chez tous les eucaryotes étudiés. L'inhibition des protéines TOR mime d'ailleurs l'état de carence. Leur rôle dans la réponse à la disponibilité en aminoacides est très conservé. Par contre, le contrôle par la voie de l'insuline a probablement été greffé à la voie de TOR au cours de l'évolution des animaux (Oldham *et al.*, 2000).

## **2.7 Potentialité d'une voie de TOR chez les plantes**

Bien qu'aucune étude d'un gène *TOR* de plante n'ait été réalisée avant le travail présenté dans ce manuscrit, plusieurs protéines impliquées dans la voie de signalisation de TOR chez les animaux et les levures ont été étudiées chez les plantes. Aucune évidence expérimentale ne permet de rattacher ces protéines à une potentielle voie de TOR de plantes, mais il est tout de même intéressant de présenter ces travaux dans l'hypothèse d'une conservation de certains effecteurs de la voie de TOR entre les plantes et les autres eucaryotes.

Il n'y a pas d'homologues des 4EBPs de mammifères dans le génome d'*Arabidopsis*. Cependant, il a été montré que la lipoxigénase 2 d'*Arabidopsis* (AtLOX2) interagit avec eIF4E et eIF(iso)4E par l'intermédiaire d'une région similaire au motif de fixation à eIF4E (Freire *et al.* 2000). De même, si aucun homologue structural des 4E-BPs n'est présent chez *S. cerevisiae*, deux protéines (appelées p20 et Eap1p) contenant le domaine consensus de fixation à eIF4E et capables d'entrer en compétition avec eIF4G pour la fixation de eIF4E, ont été décrites (Altmann *et al.*, 1997; Cosentino *et al.* 2000). L'implication de l'une de ces protéines dans la voie des protéines TOR a été démontrée par l'observation que la délétion de *EAP1* confère une résistance partielle à la rapamycine (Cosentino *et al.* 2000). Ainsi, l'absence d'homologues de 4E-BPs chez *Arabidopsis* ne reflète pas nécessairement l'absence d'une protéine régulant l'activité de eIF4E par compétition avec eIF4G. De plus, le contrôle du complexe eIF4 par les protéines TOR par le biais de protéines fixant eIF4E est la seule branche identifiée en aval de TOR qui soit conservée des levures aux mammifères et a ainsi beaucoup de chances d'avoir été aussi conservée chez les plantes.

*Arabidopsis* possède deux S6 kinases qui sont des cibles potentielles de la voie de TOR de plante. Cependant, les S6 kinases d'*Arabidopsis* n'ont pas le domaine N-terminal des S6 kinases de mammifères qui est requis pour la sensibilité à la rapamycine, et si AtS6k2 est capable de phosphoryler la protéine S6 lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules humaines, elle y est résistante à la rapamycine (Turck *et al.*, 1999).



TAP46, l'homologue d'*Arabidopsis* de TAP42 est capable de fixer la protéine phosphatase 2A et est ainsi un autre effecteur potentiel de la voie de TOR de plantes (Harris *et al.* 1999). Les inhibiteurs de protéine phosphatases tels que la calyculine A, qui ont été utilisés pour l'analyse de la voie de mTOR, ont un effet dramatique sur les plantes puisqu'ils désorganisent les microtubules (Baskin et Wilson, 1997).

Les protéines contrôlant le passage G1 à S du cycle cellulaire, qui sont sous le contrôle de mTOR chez les mammifères, sont conservées chez les plantes (Fig. 5 ; Stals et Inzé, 2001). Il est intéressant de noter que l'accumulation des cyclines D2 et D3, après addition de cytokinine ou de saccharose à des cellules carencées, peut-être inhibée par des inhibiteurs de phosphatases alors que certaines protéines phosphatases sont des effecteurs de la voie de TOR chez les *S. cerevisiae* et les mammifères (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). *Arabidopsis* possède 7 homologues de p27<sup>Kip</sup>, l'inhibiteur de CDKs (De Veylder *et al.*, 2001a).

mTOR est activé par la voie de signalisation des facteurs de croissance de type insuline chez les animaux. Cependant, il n'y a pas d'évidence claire de l'existence d'une voie de signalisation de ce type chez les plantes. D'une part, le génome d'*Arabidopsis* ne contient pas d'homologues de récepteur à l'insuline (The *Arabidopsis* initiative, 2000). D'autre part, si des PI3P et des PI(3,4)P2 ont été détectés chez plusieurs plantes, aucune tentative de détection de PI(3,4,5)P3 n'a été fructueuse (Munnik *et al.*, 1998). Un homologue de PDK1 de mammifère a été identifié chez *Arabidopsis* (AtPDK1) (Deak *et al.*, 1999). Il contient un domaine de fixation aux PtdTns(3, 4, 5)P3 et est capable d'activer la protéine PKB humaine *in vitro* mais aucun homologue de PKB n'a été identifié dans le génome d'*Arabidopsis*.

La wortmannine est un inhibiteur de la voie de signalisation de l'insuline dont la spécificité est controversée chez les mammifères (chap 2. 4). Les rares expériences utilisant la wortmannine chez les plantes ont montré qu'elle inhibe le transport de protéines vers la vacuole et l'endocytose dans des cellules de tabac (Matsuoka *et al.*, 1995 ; Emans *et al.*, 2002). Cependant, la wortmannine n'inhibe pas seulement les PI3-kinases, mais aussi les PI4-kinases dans ces cellules de tabac (Matsuoka *et al.*, 1995). Ce manque de spécificité limite son utilisation pour étudier une potentielle voie des PI3-K chez les plantes.

Une protéine, appelée ZmIG (*Zea mays* Insulin-like growth factor) et capable de favoriser la germination du maïs, a récemment été purifiée à partir d'extraits d'hypocotyles de maïs par chromatographie d'affinité pour un anticorps dirigé contre l'insuline bovine (Garcia Flores *et al.*, 2001). Ces auteurs ont aussi présenté des résultats indiquant que le traitement d'hypocotyles de maïs par l'insuline ou ZmIGF induit la phosphorylation de la protéine S6 et que cette phosphorylation est légèrement inhibée par la rapamycine (Garcia Flores *et al.*, 2001). Cependant aucun effet clair de la rapamycine sur la croissance du maïs n'est présenté dans cette

étude. De plus, la rapamycine n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la protéine S6 dans des pointes racinaires de maïs (Julia Bailey-Serres, University of California, Riverside, USA, communication personnelle). Enfin, ces expériences n'ont été menées que lors des premiers jours après germination, sans doute à cause des difficultés de culture *in vitro* dues à la taille d'une plantule de maïs. Ainsi, la présence d'une voie de signalisation de type insuline chez les plantes reste un sujet de controverse qui nécessitera d'autres investigations.

La conservation de la voie de signalisation de TOR des levures aux animaux, ainsi que la présence d'homologues de protéines de la voie de TOR chez *Arabidopsis*, suggèrent qu'une voie de TOR existe aussi chez les plantes, et qu'elle présente certaines particularités liées au mode de vie de ces organismes. Dans le cadre de l'initiation d'un projet d'étude de la voie de TOR chez les plantes, nous avons caractérisé AtTOR, l'homologue d'*Arabidopsis* des protéines TOR. Le clonage de l'ADNc de *AtTOR* a ensuite permis d'analyser la structure du gène et de la protéine AtTOR, et nous a amené à étudier la capacité du domaine FRB de AtTOR à interagir avec la rapamycine. Une approche de génétique inverse a été menée afin d'analyser la fonction de AtTOR. Une fusion traductionnelle entre *AtTOR* et un gène rapporteur a enfin permis d'analyser précisément le profil d'expression de *AtTOR*.

# RESULTATS

## 1 Rapamycine et croissance des plantes

Les travaux décrits en introduction mettent en évidence le rôle crucial qu'a eu l'utilisation de la rapamycine dans l'élucidation de la voie de TOR chez *S. cerevisiae* et chez les mammifères. Nous avons donc étudié l'effet de la rapamycine sur la croissance des plantes.

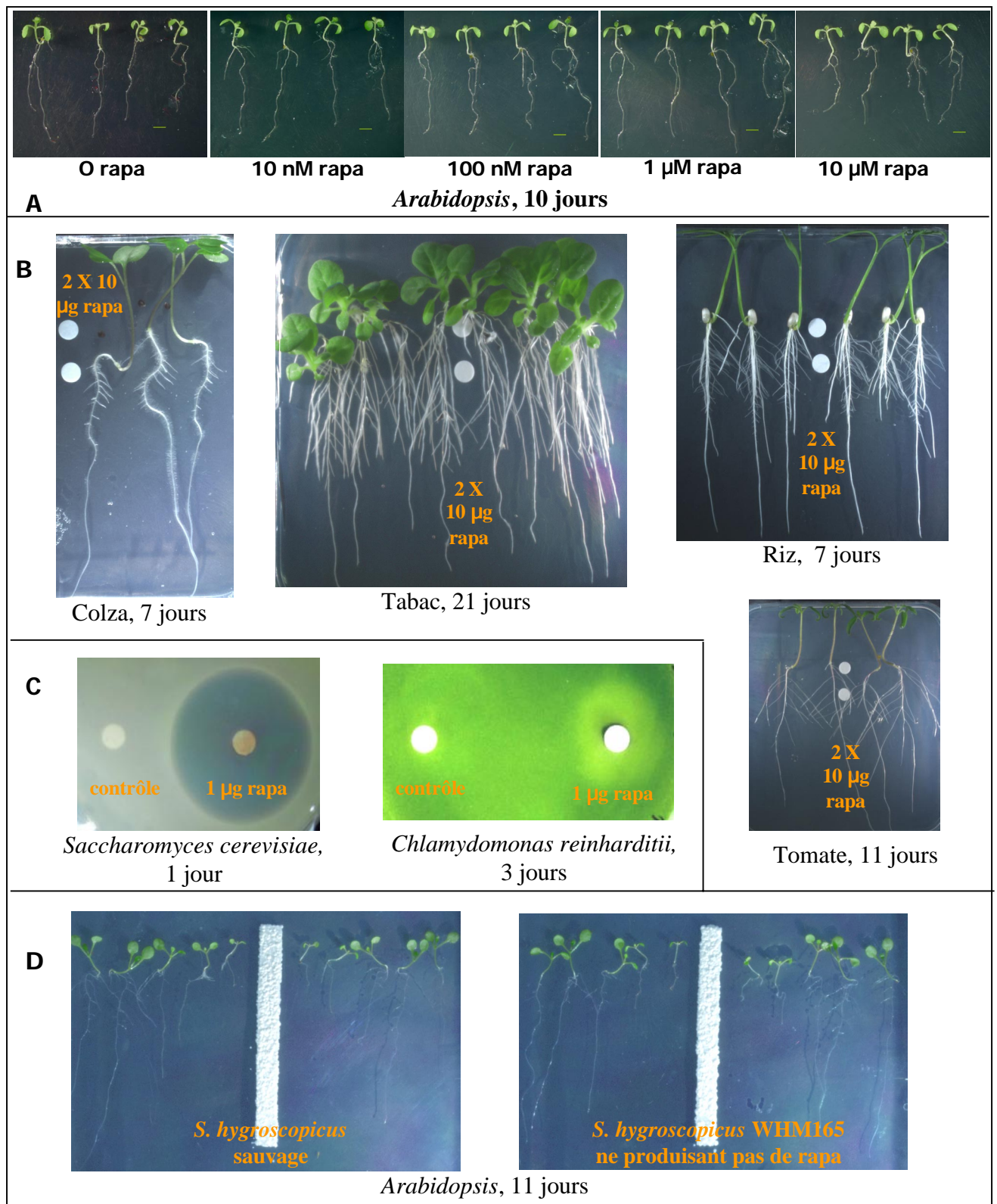
### 1.1 Sensibilité d'*Arabidopsis* à la rapamycine

L'effet de la rapamycine sur la croissance végétative d'*Arabidopsis* a été testé (Fig. 15A). Pour cela, des graines d'*Arabidopsis* ont été semées sur des milieux contenant des concentrations croissantes de rapamycine et les plantes ont été observées 10 jours après germination. Il en résulte que la croissance végétative d'*Arabidopsis* n'est pas inhibée par la rapamycine, même à une concentration de 10  $\mu$ M qui est 100 fois supérieure à la concentration efficace sur *S. cerevisiae* (Fig. 15A ; Heitman *et al.*, 1991).

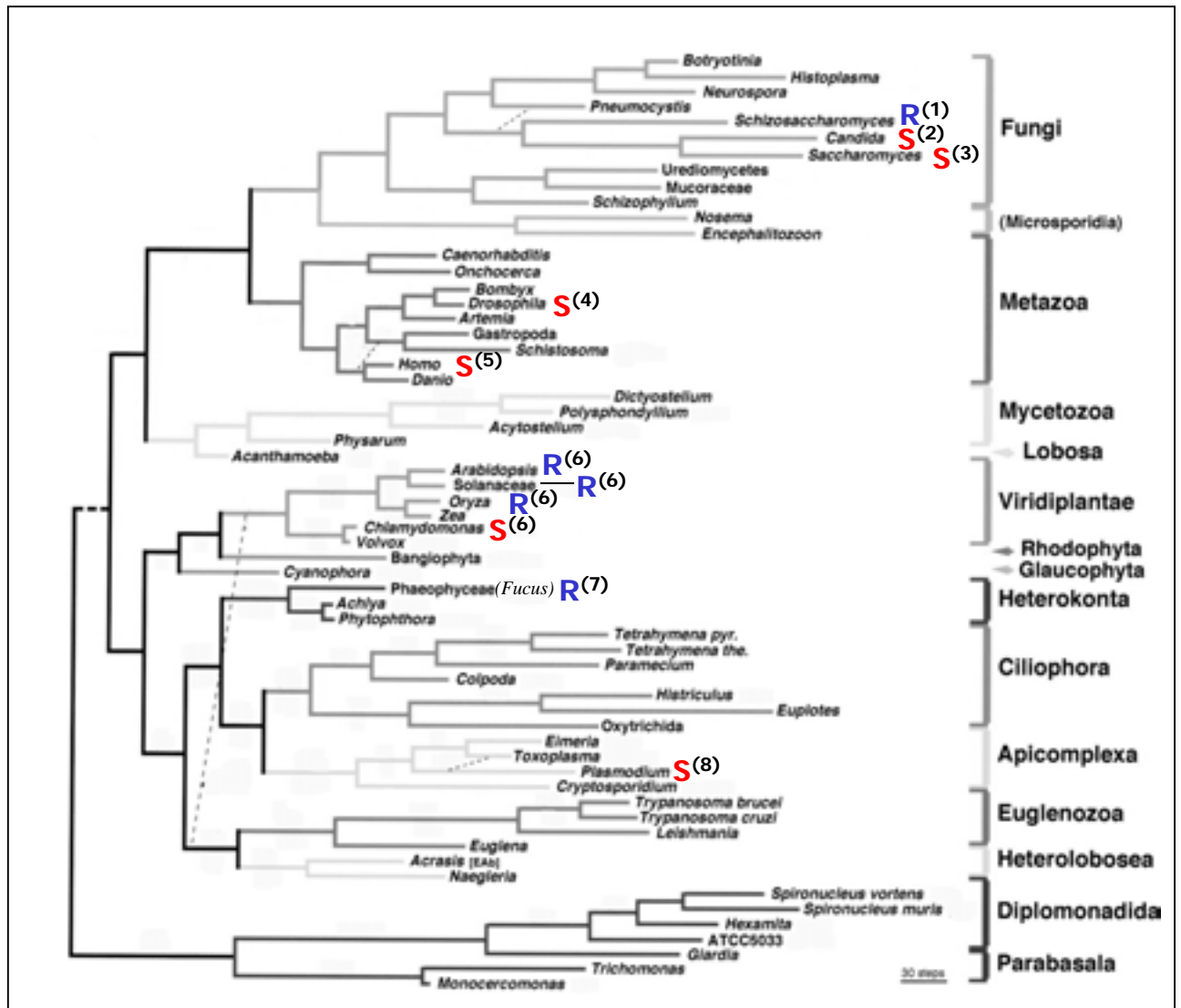
### 1.2 Sensibilité d'autres plantes à la rapamycine

La résistance à la rapamycine peut être une particularité d'*Arabidopsis* ou être une capacité commune à d'autres plantes. Afin d'étudier cette question, la rapamycine a été testée sur plusieurs plantes en faisant pousser des graines à différentes distances d'un disque de papier whatman imbibé d'une forte dose de rapamycine (Fig. 15B). Cela conduit à un gradient de rapamycine (celle-ci diffusant dans l'agar) qui dans le cas d'une sensibilité des plantes conduirait à une croissance altérée des plantes les plus proches du disque de rapamycine par rapport aux plantes éloignées. Cependant, aucune des plantes testées (riz, colza, tomate et tabac) n'a sa croissance altérée au contact de la rapamycine (Fig. 15A). La bryophyte *Physcomitrella patens* et l'algue brune *Fucus spiralis* sont aussi résistantes à la rapamycine (Fabien Nogué, INRA de Versailles et François Yves Bouget, station biologique de Roscoff, communications personnelles). Par contre l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, s'est avérée sensible à la rapamycine puisque sa croissance est inhibée au contact de cette drogue (Fig. 15C).

Un arbre phylogénétique récapitulant les données de résistance ou de sensibilité de la croissance végétative des eucaryotes à la rapamycine est présenté dans la figure 16. Il en ressort que la résistance à la rapamycine est apparue plusieurs fois de façons indépendantes au cours de l'évolution. L'un de ces événements a eu lieu au cours de l'évolution des plantes terrestres. La résistance à la rapamycine ne signifie pas l'absence d'une voie de TOR, mais rend plus difficile l'étude de cette voie de signalisation chez l'organisme en question (Weisman et Choder, 2001).



**Fig 15 : Effet de la rapamycine sur la croissance végétative des plantes.** **A**, *Arabidopsis* cultivé *in vitro* en présence de concentrations croissantes de rapamycine. **B**, effet de la rapamycine sur 4 plantes différentes. La rapamycine a été déposée sur le disque de papier whatman avant germination. **C**, Sensibilité de *S. cerevisiae* et *C. reinhardtii* à la rapamycine. Une unité de DO<sub>600nm</sub> a été mélangée à de l'agar à 0,7% et déposée de manière homogène sur la boîte de pétri contenant le milieu de culture adéquat, puis un disque de papier whatman avec ou sans rapamycine a été ajoutée avant la mise en culture. Le nombre de jours indiqué correspond aux jours de culture. **D**, inhibition de la croissance végétative d'*Arabidopsis* par une souche sauvage de *Streptomyces hygroscopicus* (à gauche) et par une souche ne produisant pas de rapamycine (à droite). Les bactéries (une unité de DO<sub>600nm</sub>) ont été déposées sur la bande de papier whatman 4 jours après germination.



**Figure 16 : arbre phylogénétique des eucaryotes indiquant les organismes testés pour la sensibilité de leur croissance végétative à la rapamycine.** Il s'agit d'un arbre, basé sur les données combinées de plusieurs séquences protéiques (EF-1 $\alpha$ , actine,  $\alpha$ -tubuline et  $\beta$ -tubuline), reproduit d'après Baldauf *et al.* (2000). **R**, résistant à la rapamycine ; **S**, sensible à la rapamycine. D'après : (1) Weisman *et al.*, 1997 ; (2) Vézina *et al.*, 1975 ; (3) Heitman *et al.*, 1991 ; (4) Zhang *et al.*, 2000 ; (5) Brown *et al.*, 1994 ; (6) cette étude ; (7) F.-Y. Bouget, communication personnelle ; (8) Berriman et Fairlamb, 1998.

### 1.3 Inhibition de la croissance d'*Arabidopsis* par *Streptomyces hygroscopicus*

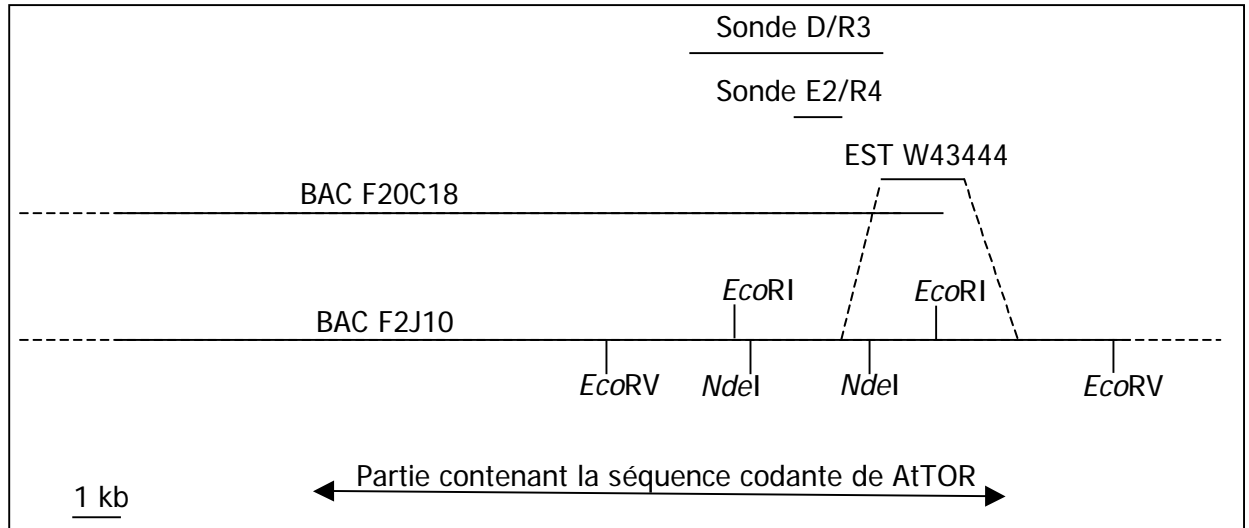
La résistance des plantes à la rapamycine pourrait être une manière de résister à la bactérie du sol *Streptomyces hygroscopicus* qui produit cette drogue. Nous avons donc testé l'effet de molécules produites par cette bactérie et diffusibles dans l'agar sur la croissance végétative. Pour cela, des bactéries ont été placées sur une bande de papier whatman au centre d'une boîte de pétri contenant des plantules d'*Arabidopsis* venant de germer. Il en résulte une forte inhibition de la croissance des plantules les plus proches des bactéries, ce qui montre que *S. hygroscopicus* produit une ou plusieurs molécules qui inhibent fortement la croissance d'*Arabidopsis* (Fig. 15D). Cependant, une souche de cette bactérie délétée d'un gène nécessaire à la production de la rapamycine inhibe aussi efficacement la croissance d'*Arabidopsis* que la souche sauvage (Fig. 15D ; Lomovskaya *et al.*, 1997). Ainsi, la résistance d'*Arabidopsis* à la rapamycine n'est pas suffisante pour conférer la résistance à *S. hygroscopicus*, cette bactérie devant produire d'autres composés capables d'inhiber la croissance des plantes, comme l'hygromycine B.

## 2 Caractérisation du gène *TOR* d'*Arabidopsis*

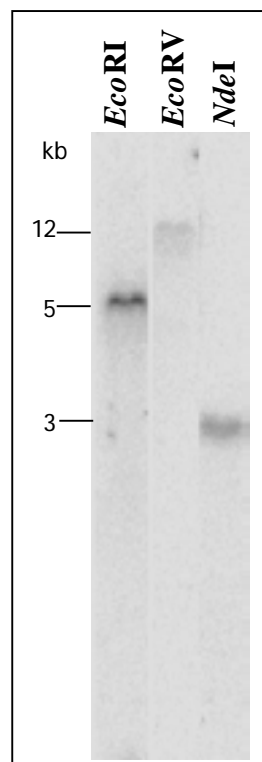
### 2.1 Identification d'un gène *TOR* dans le génome d'*Arabidopsis*

Dans un premier temps, une EST d'*Arabidopsis* (n° d'accès : W43444) présentant un fort taux de similarité avec la partie C-terminale de mTOR a été identifiée par Christian Meyer (Laboratoire de Nutrition azotée, INRA de Versailles) en interrogeant la base de donnée TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource). Cette EST complète de 2,5 kb a été séquencée et la séquence d'acides aminés correspondante a été alignée avec la séquence protéique de mTOR. Elle présente 49 % de taux de similarité avec les résidus 1702 à 2249 de mTOR et comprend notamment un domaine homologue au domaine FRB caractéristique des protéines TOR. La protéine correspondant à cette EST a donc été nommée AtTOR pour *Arabidopsis thaliana* TOR.

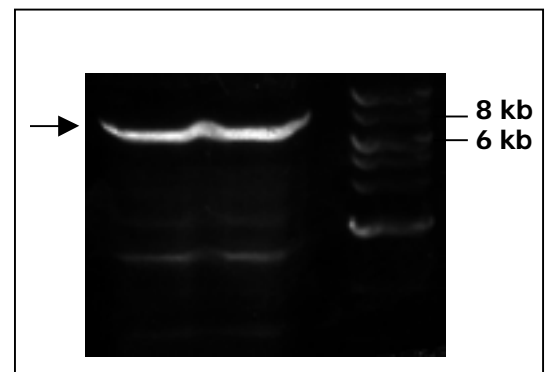
Un BAC (BAC F20C18 ; n° d'accès : B18861) contenant la majeure partie de la séquence génomique de AtTOR (Fig. 17) a ensuite été identifié par BLAST avec l'EST W43444 dans la banque de donnée TAIR. Ce clone a été séquencé en totalité par l'équipe du Centre National de Séquençage d'Evry. Étant donné qu'il ne contient pas la totalité de la séquence génomique de AtTOR puisqu'il est interrompu au niveau du domaine kinase, la partie manquante a été amplifiée par PCR sur de l'ADN de l'écotype Columbia avec les amorces TOR F2 et TOR R1 dessinées à partir de l'EST W43444, puis séquencé (Tab 1). Les données de cartographie de ces BACs ont permis de localiser AtTOR sur le bras inférieur du chromosome 1. Un BAC



**Figure 17 : position des clones utilisées lors du séquençage de *AtTOR*.** La position des sondes TOR E2/R4 et TOR D/R3 ainsi que les sites de restrictions utilisées pour la figure 20 sont indiqués.



**Figure 18 : analyse d'ADN sauvage (WS) par transfert de Southern avec une sonde E2/R4.**



**Figure 19 : amplification de l'ADNc de *AtTOR* par RT-PCR.** Electrophorèse du produit d'une PCR avec les amorces TORR1 et TOR7 et comme matrice, une RT réalisée à partir d'ARN totaux de racines, avec l'amorce TORR1. La bande correspondant à la taille prévue de l'ADNc de *AtTOR* est indiquée par une flèche. Elle a été purifiée puis clonée et séquencée.

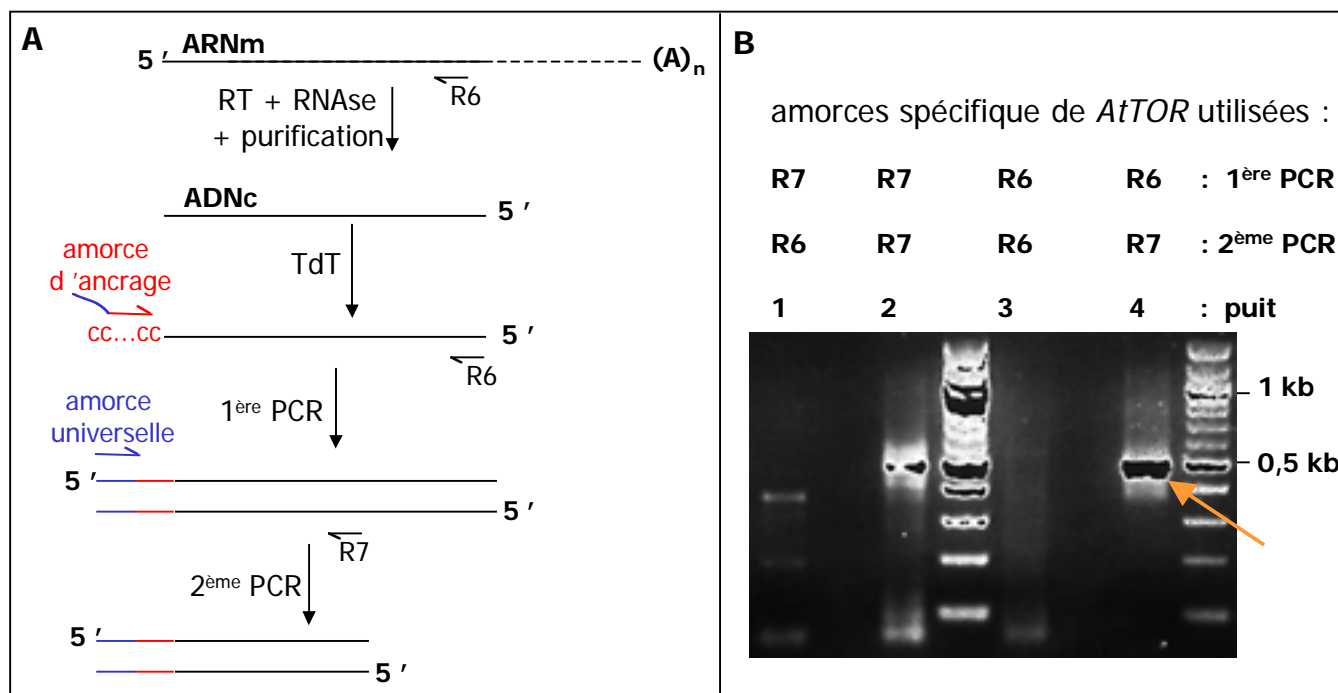
(F2J10, n° d'accès : AC015445) contenant la totalité du gène *AtTOR* (Fig. 17) a été identifié ultérieurement dans la banque de donnée TAIR. Aucun autre gène *TOR* n'est identifiable dans la séquence publiée du génome d'*Arabidopsis*, ce qui suggère que *AtTOR* n'est pas un gène dupliqué. Cela a été confirmé par une analyse par transfert de Southern réalisée avec une sonde *AtTOR* couvrant le domaine FRB et 3 enzymes de restriction différentes, qui montre que seules les bandes attendues sont observées (Fig. 17 et 18).

## 2.2 Clonage de l'ADN complémentaire de *AtTOR*

Certains logiciels permettent de prédire la position des introns à partir d'une séquence génomique et d'en déduire la séquence de l'ADNc. Cependant, ces programmes ne sont pas totalement fiables, notamment pour les grands gènes, car des jonctions non-canoniques entre les introns et les exons peuvent exister (Garcia *et al.*, 2000). Nous avons donc entrepris d'obtenir expérimentalement l'ADNc de *AtTOR* à partir d'ARN de racines en effectuant une transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (RT-PCR). Cela est d'autant plus intéressant qu'un ADNc complet peut s'avérer utile pour des expériences ultérieures de modification de l'expression de *AtTOR*. Un produit de RT-PCR compris entre 7 et 8 kb a pu être obtenu en utilisant les amorces R1 et 7 dessinées respectivement à partir de l'extrémité 3' de l'EST et à partir de la partie 5' de la séquence génomique correspondant à l'ATG initiateur prédit de *AtTOR* (Fig. 19 ; Tab. 1). Ce fragment d'ADN a été cloné dans le plasmide pCR-XL-TOPO, puis séquencé en totalité avec des amorces couvrant tout le gène et également dessinées à partir de la séquence génomique (Tab. 1).

Une expérience d'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc (5' RACE) a ensuite été réalisée afin d'identifier le site d'initiation de la transcription de *AtTOR* (Fig. 20). Cette méthode consiste en une transcription inverse réalisée avec une amorce spécifique de *AtTOR* qui est suivie de l'addition d'une queue de dCTP à l'extrémité 3' du fragment simple brin d'ADNc grâce à un traitement à la terminal deoxynucleotidyl transferase (Fig. 20A). Deux PCR successives sont ensuite réalisées avec une amorce spécifique de la queue ainsi créée et une amorce spécifique de *AtTOR*. Les résultats obtenus montrent l'intérêt d'utiliser, pour la deuxième PCR, une amorce spécifique de *AtTOR* qui soit décalée par rapport à la première amorce (comparez le puits 4 avec les puits 2 et 3 de la Fig. 20B). Le séquençage du fragment amplifié par 5'RACE a permis d'identifier une séquence de tête de 230 pb en amont du premier AUG de la séquence codante de *AtTOR*. Il est intéressant de noter que cette séquence de tête contient un petit cadre ouvert de lecture de deux codons en amont du site d'initiation de la traduction de *AtTOR* (Fig. 21). De telles uORFs (« upstream Open Reading Frame ») peuvent jouer un rôle dans des régulations traductionnelles de l'expression de la séquence codante qu'elles précèdent, comme c'est le cas





**Figure 20 : amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc de *AtTOR*.** **A**, schéma de la méthode utilisée. L'exemple montré utilise les amorces qui ont donné le meilleur résultat. **B**, Electrophorèse des produits de la 2<sup>ème</sup> PCR résultants de l'utilisation dans différents ordre des amorces TOR R6 et R7. L'amorce R6 est décalée de 435 pb par rapport R7. Aucune bande n'était visible sur gel d'agarose après la 1<sup>ère</sup> PCR. La flèche indique le fragment qui a été purifié et séquencé. Tdt, terminale deoxynucleotidyl transferase.

1	AAAGCAAAACCUAAGAAAGCUAAAAAGACACUCAGCGAAUUGAAUUUGUAAAAAAUAAGAGAAAAAAUCUUGAUUUUCUUCUGCG	85																					
86	AUCUUCGGUUCUCGACGCAUC	AUG	UGU	UGA	AGA	UUCUUCUAUCU	UCCUCUGUACA	UACUCUCUCUCUGCCCAAGUGUUGUU	166														
1		M	C	*					3														
167	GAACCAAAAAGGGGUCAGAUUUAGGGUUUUUGGAAGA	UUUUUGUGGCUGGACUGGCC	UCG	CAGCG	AUG	UCU	ACC	UCG	UCG	247													
1						M	S	T	S	S	5												
248	CAA	UCU	UUU	GUG	GCU	GGA	CGG	CCU	GCA	UCC	AUG	GCU	UCC	CCU	UCG	CAA	UCG	CAC	CGC	UUU	UGU	G	311
6	Q	S	F	V	A	G	R	P	A	S	M	A	S	P	S	Q	S	H	R	F	C	G	27
312	GU	CCC	UCA	GCC	ACC	GCU	UCU	GGU	GGC	GGA	AGC	UUU	GAC	...									
28	P	S	A	T	A	S	G	G	G	S	F	D	...										

**Figure 21 : extrémité 5' de l'ARNm de *AtTOR* (350 premières bases).** Le cadre ouvert de lecture situé en amont (uORF) de la séquence codante pour *AtTOR* est encadré.

pour CLN3 de *S. cerevisiae* ou pour les activateurs de transcription R de maïs (Polymenis et Schmidt, 1997 ; Wang et Wessler, 1998).

D'autre part, la 5' RACE a montré que le site d'initiation de la traduction de AtTOR était légèrement en amont de TOR 7. Nous avons donc complété l'ADNc cloné en 5' par un fragment de RT-PCR amplifié avec les amorces TOR 6 (apportant un site *EcoRV*) et TOR R6 et digéré par les enzymes *EcoRV* et *AgeI* (site unique dans l'ADNc de *AtTOR*, en amont de TOR R6). Les séquences du gène AtTOR, de l'ADNc et de la protéine correspondante ont été déposées auprès de la banque de données Genbank (n° d'accès : AF178967).

Des séquences canoniques de polyadénylation ont été détectées une cinquantaine de paires de base en aval du codon STOP de *AtTOR*. Les cinq séquences canoniques des extrémités 3' des ARNm de plantes sont observables chez *AtTOR* (Fig. 22; Graber *et al.*, 1999). Deux sites de clivages potentiels très proches l'un de l'autre sont visibles. La taille de l'ADNc de *AtTOR* est de 7780 bases du site d'initiation de la transcription identifié par PCR, au premier site de clivage détecté en 3'.

### 2.3 Structure du gène AtTOR

L'alignement de la séquence de l'ADNc avec la séquence génomique de *AtTOR* a révélé l'existence de 55 introns et 56 exons (Fig. 23) sur une distance de 17 kb. Un nombre aussi élevé d'introns est rare, mais est inférieur à celui du gène *AtATM*, qui code pour un autre membre de la famille des PI3K related-kinases (Garcia *et al.*, 2000). Ce grand nombre d'introns n'est pas commun à tous les gènes *TOR* puisque *dTOR* ne contient que 6 introns alors que les gènes *TOR* de *S. cerevisiae* et *S. pombe* n'en ont aucun (Zhang *et al.*, 2001 ; Kawai *et al.*, 2001). Seulement la moitié 5' de la séquence génomique du gène *mTOR* humain est connue. Elle contient 25 introns et couvre 80 kb. Aucune séquence promotrice typique n'a été détectée en amont de la séquence de tête.

### 2.4 La protéine AtTOR

La séquence protéique de AtTOR, déduite de la séquence de l'ADNc, contient 2481 aminoacides, a une masse moléculaire de 279 kDa et présente des taux de similarité de 42 % avec SpTOR2, 40 % avec mTOR, 39 % avec Sp TOR1, dTOR et ScTOR2, et 37 % avec ScTOR1. Notons que 5 régions longues d'une dizaine d'aminoacides sont soit ajoutées, soit supprimées par rapport à la séquence protéique obtenue par prédiction à partir de la séquence du BAC F2J10 (voir genbank, n° d'accès : AC015445). Il s'agit de décalages d'une trentaine de bases de sites d'épissage au niveau des introns 5, 21, 44 et 55, et de l'élimination du petit exon 19 lors de la prédiction. Ces différences révèlent les limites des logiciels de prédiction des

```

17133 CUAACCCCGAUUGCUUUAGUUCAUUUAAAAUUGAACAUGCAUAUUUCUU
      L N P D C F S S F K I E H A Y F L

17184 GUGUUUGUUCUUUUAAUACAGGUGGUGCCCUUUCUGGUGAGAUGGGUCAU
      C L F F Y Y R W C P F W *

17234 CUGUACAUUUUUAAUGUAAAUAGGCUUUUUAAUUUUC AACUAAU UUGCAU
                                                    EA

17284 UUAUGUUUGACUAAUUCGAU AAUAAACUAUGUUC UUUUUAAUGU AAU AA
                        EP             riche U       SC  SC

17334 UUUAAUAGUUUCAUAGUCAUGUAUUAAUACAUGAUGUAGCGUGGAUGAAU
      riche U

17384 AAAUGGGCAGGUCACCUUUUUUACUUUUCUGAAAUAUACAUUCUCAUAUC

17434 CUCAAGGUAAUUUAAUGGAAUUGCGACAAAAGAAGAAGAAGAAGAUG

```

**Figure 22 : Séquence en 3' du codon STOP de *AtTOR* montrant les signaux canoniques de polyadenylation.** Les numéros correspondent à la séquence génomique (0 = début de transcription). Les signaux canoniques de polyadénylation sont indiqués en rouge. EA : élément en aval ; EP élément de positionnement ; riche U : élément riche en U ; SC ; site de clivage (deux sites potentiels). Les signaux canoniques sont indiqués sont tirés d'une étude *in silico* réalisée sur des extrémités 3' d'ARNm de plantes (Graber *et al.*, 1999).

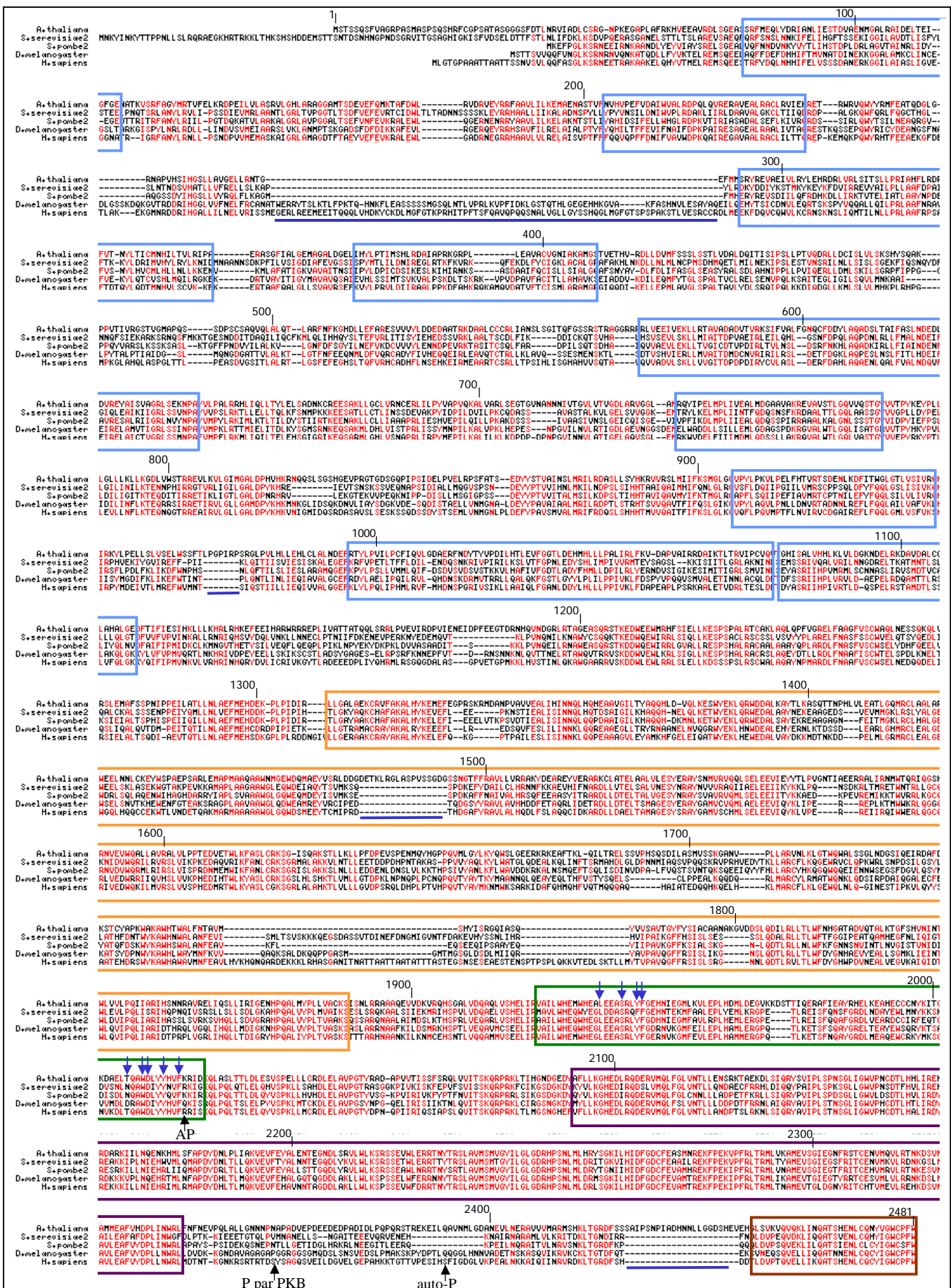


**Figure 23 : Représentation schématique de la structure intron/exon du gène *AtTOR*.** Les exons sont en noir et les introns en blanc.

jonctions entre exons et introns et soulignent la nécessité d'obtenir la séquence de l'ADNc expérimentalement. Il est aussi possible que de l'épissage alternatif ait lieu.

La séquence protéique de AtTOR a été alignée avec les séquences de ScTOR2, SpTOR2, dTOR et mTOR afin de mettre en évidence la conservation des domaines (Fig. 24, voir sous-chapitre 2.1.3 de l'introduction pour les domaines caractéristiques des protéines TOR). Cet alignement met en évidence une très forte conservation des domaines FRB, kinase et FATC entre AtTOR et les autres protéines TOR (respectivement 58 %, 75 % et 74 % de taux d'identité avec les domaines équivalents de mTOR). Nous pouvons remarquer que les aminoacides qui interagissent avec la rapamycine dans le complexe ternaire FRB-rapamycine-FKBP12 de mammifères sont conservés chez AtTOR (Fig. 24 ; Choi *et al.*, 1996), ce qui suggère que le domaine FRB de AtTOR pourrait être capable d'interagir avec la rapamycine. Une analyse de la capacité du domaine FRB de AtTOR à fixer la rapamycine sera décrite dans le sous-chapitre 3.2. Contrairement aux aminoacides d'interaction avec la rapamycine, les sites d'autophosphorylation de mTOR et de phosphorylation par la protéine kinase B ne sont pas conservés chez AtTOR (Fig. 24 ; Peterson *et al.*, 2000 ; Navé *et al.*, 1999). Notons que ces sites de phosphorylation ne sont pas non plus conservés chez dTOR dont l'activation est indépendante de PKB (Fig. 24 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Radimerski *et al.*, 2002). L'Arginine 2109 de mTOR, qui est impliquée dans l'interaction avec l'acide phosphatidique, n'est pas non plus conservée chez AtTOR, mais elle est remplacée par un résidu lysine qui est proche en taille et en charge de l'arginine (Fig. 24 ; Fang *et al.*, 2001).

Le reste de la protéine est moins conservé que les domaines décrits précédemment, mais un domaine FAT est quand même identifiable chez AtTOR (Fig. 24). Étant donné que les protéines TOR possèdent des répétitions HEAT, la séquence de AtTOR a été soumise à un programme d'identification de motifs répétés (Andrade *et al.*, 2000). Cette analyse a permis d'identifier 12 répétitions HEAT situées dans les deux tiers terminaux de la protéine AtTOR (Fig. 24). Les résidus qui les composent sont moins conservés que ceux des domaines FRB, kinase ou FATC car de telles répétitions sont caractérisées par une conservation de leur structure secondaire plutôt que de leur structure primaire (Andrade *et al.*, 2000). Des répétitions HEAT ont été précédemment identifiées au sein d'une autre protéine d'*Arabidopsis*, MOR1 (Microtubule Organisation 1), qui appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (Whittington *et al.*, 2001). L'importance de ces répétitions HEAT a été mise en évidence par le fait que les deux allèles mutants thermosensibles de *MORI* isolés lors d'un crible de mutants de désorganisation des microtubules, correspondent à des mutations ponctuelles dans une répétition HEAT.



**Figure 24 :** Alignement de AtTOR avec ScTOR2, SpTOR2, dTOR et mTOR. Les résidus conservés sont en rouge. Les régions encadrées représentent les répétitions HEAT (bleu), et les domaines FAT (orange), FRB (vert), kinase (violet) et FATC (marron). Les régions spécifiques de AtTOR ou absentes de AtTOR mais présentes chez d'autres TORs sont soulignées en bleu. Les flèches bleues indiquent les résidus qui interagissent avec la rapamycine (Choi et al., 1996). Les flèches indiquent les sites de phosphorylation (P) de mTOR et les sites de fixation de l'acide phosphatidique (PA) à mTOR. La numérotation correspond aux résidus de AtTOR.

Enfin, il est intéressant de noter que de courtes régions spécifiques de AtTOR sont apparues au cours de l'évolution des plantes notamment une séquence de 22 résidus entre les domaines kinase et FATC (Fig. 24). Par contre, une région d'environ 80 résidus aminoacides est présente chez les protéines TOR de drosophile et de mammifère, mais est absente de AtTOR et des protéines TOR de levures, ce qui suggère qu'elle est apparue au cours de l'évolution des animaux. Cette séquence située à proximité de l'extrémité N-terminale (Fig. 24) n'a pas de fonction connue.

## 2.5 Présence de gènes TOR chez d'autres plantes

Des ESTs codant pour des homologues de AtTOR ont été recherchées chez d'autres plantes avec la base de données du TIGR (The Institute for Genomic Research). Cela a permis d'identifier des homologues de AtTOR chez la tomate (*Lycopersicon esculenta*, clone AI483216), la pomme de terre (*solanum tuberosum*, clones BG598555 et BG097173), le sorgho (*Sorghum bicolor*, clone BE599404 et TC18552), le soja (*Glycine max*, clone BF425216), le blé (*Triticum aestivum*, clones TC9713 et BF485305), le maïs (*Zea mays*, clones AI855172, AW067098 et AI901838), l'orge (*Hordeum vulgare*, clones BF260813, BF267482, TC1543 et BF624519) et *Medicago truncatula* (clones TC38665, TC38229, BE204177, et BI312146). Le fait que les génomes de ces plantes ne soient pas séquencés ne permet pas de dire si les gènes correspondant à ces ADNc sont uniques, mais ces informations confirment la présence d'au moins un gène *TOR* dans toutes ces plantes. Nous n'avons pas identifié d'homologues de AtTOR dans les génomes de *Physcomitrella patens* et *Chlamydomonas reinhardtii*, mais cela s'explique par le faible nombre d'EST disponibles pour ces organismes. Ainsi, le gène *TOR* est conservé dans de nombreuses plantes et met en évidence la nécessité de l'étudier chez la plante modèle *Arabidopsis* afin d'en dévoiler les caractéristiques particulières aux plantes.

## 3 Analyse par génétique inverse de la fonction de AtTOR et de son profil d'expression

Une manière de découvrir la fonction d'un gène est d'obtenir une mutation de perte de fonction de ce gène, et d'analyser le phénotype du mutant qui en résulte. Si ce type d'approche est réalisé efficacement chez les microbes et la souris en remplaçant le gène sauvage par un allèle muté (par recombinaison homologue), cela n'est pas possible chez les plantes. Une alternative, efficace et largement utilisée chez *Arabidopsis*, est le criblage de collections de plantes mutagénisée avec un élément d'insertion mobile (transposons) ou stable (ADN-T)

(Bouchez et Höfte, 1998). L'ADN-T est une séquence d'ADN, portée par un plasmide bactérien, qui est intégrée dans le génome nucléaire de la plante lors de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (Gelvin, 2000). Des ADN-T sauvages ont été modifiés puis utilisés pour générer des banques de mutants aléatoires. Ainsi, un ADN-T contenant le gène rapporteur *GUS* (codant la  $\beta$ -glucuronidase) ainsi que les gènes *NPTII* (codant la neomycine phosphotransférase II) et *BAR* (codant la phosphinothricine acétyl transférase), qui confèrent respectivement la résistance à la kanamycine et au BASTA, a été utilisé pour créer la banque de mutants aléatoires d'insertion de Versailles (Bouchez *et al.*, 1993 ; Bechtold *et al.*, 1993). Il est possible d'identifier des mutants pour un gène d'intérêt en criblant cette collection de mutants par PCR avec des amorces complémentaires des bornes d'insertion de l'ADN-T et du gène d'intérêt (Fig. 25). La PCR est une technique suffisamment sensible pour détecter de tels événements à partir de grands pools d'ADN de plantes mutagénisées. Alternativement, l'ADN flanquant chacune des mutations de la collection peut être séquencée ; ces séquences sont ensuite criblées *in silico*.

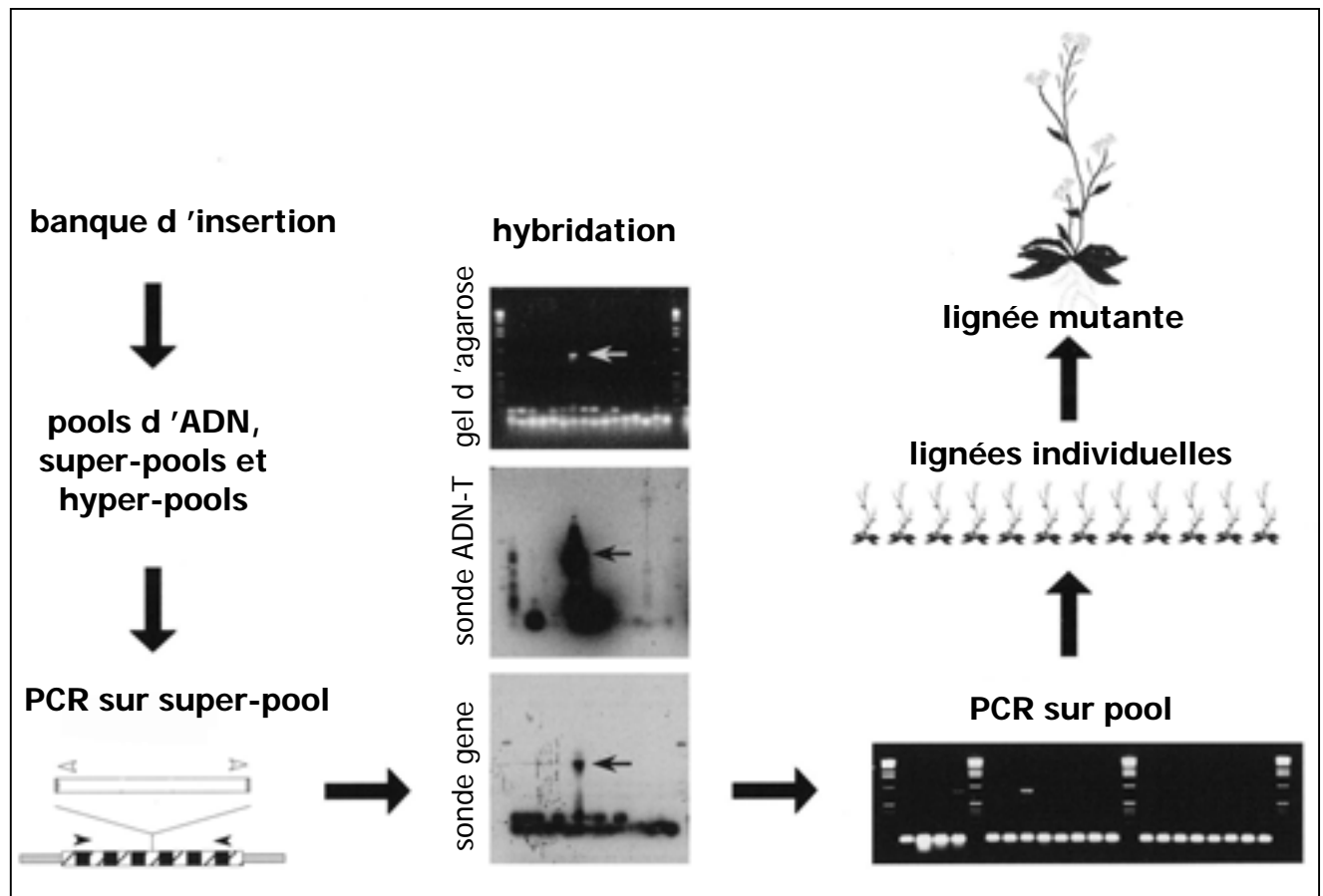
## **1.1 Identification de mutants d'insertion d'ADN-T dans le gène *AtTOR***

Ce chapitre décrit en détail la façon dont nous avons obtenu deux mutants de *AtTOR* à partir de la banque de mutants d'insertion d'un ADN-T de Versailles. Ces deux mutants ont été isolés à peu près au même moment. Le fait de disposer de deux allèles mutants a été nécessaire pour confirmer que le phénotype est causé par l'insertion de l'ADN-T dans le gène *AtTOR* (voir chapitre 3.2).

### **1.1.1 Isolement d'un mutant de *AtTOR* avec un crible par PCR**

La stratégie du crible par PCR avec des amorces complémentaires du gène d'intérêt et des extrémités de l'ADN-T a été utilisée afin d'identifier des allèles mutants de *AtTOR* (Bouchez et Höfte, 1998). J'ai effectué ce travail lors d'un stage au sein de l'équipe de David Bouchez du Laboratoire de Biologie Cellulaire de l'INRA de Versailles.

Les différentes étapes du crible sont décrites dans la figure 25. Dans un premier temps, les réactions de PCR ont été réalisées séparément sur 39 hyper-pools d'ADN génomique contenant un mélange de 16 pools dont chacun correspond à une extraction d'ADN génomique réalisé à partir de 48 lignées indépendantes (Granier *et al.*, 1999). Cela correspond à 29952 lignées d'insertion indépendantes (chacune contenant au moins un ADN-T). Chaque amorce complémentaire à *AtTOR* est utilisée avec une amorce complémentaire à la bordure gauche (LB) de l'ADN-T (TAG5, Tab. 2) et une autre amorce (TAG3, Tab. 2) complémentaire à la bordure



**Figure 25 : les différentes étapes du crible par PCR des mutants d'insertion de l'ADN-T de la banque de Versailles.** Les ADN génomiques ont été extraits à partir de pools de plantes mutagenisées, puis groupés en pools plus larges (ce travail est réalisé par plusieurs équipes de l'INRA de Versailles). Les PCR sont réalisées sur les ADN des hyper-pools en utilisant un couple d'amorces correspondant au gène d'intérêt et à l'une des bornes de l'ADN-T. Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, transférés sur deux membranes de nylon et hybridés avec une sonde complémentaire du gène d'intérêt (sonde gène) et une sonde complémentaire de l'ADN-T (sonde ADN-T). Seuls les hyper-pools montrant un produit de PCR hybridant avec les deux sondes sont sélectionnés. Le produit de PCR est alors séquencé puis le crible par PCR est poursuivi sur les différents pools constituant le super-pool, et enfin, sur les lignées individuelles du pool positif jusqu'à isolement de la lignée portant une insertion dans le gène d'intérêt. D'après Bouchez et Höfte, 1998.

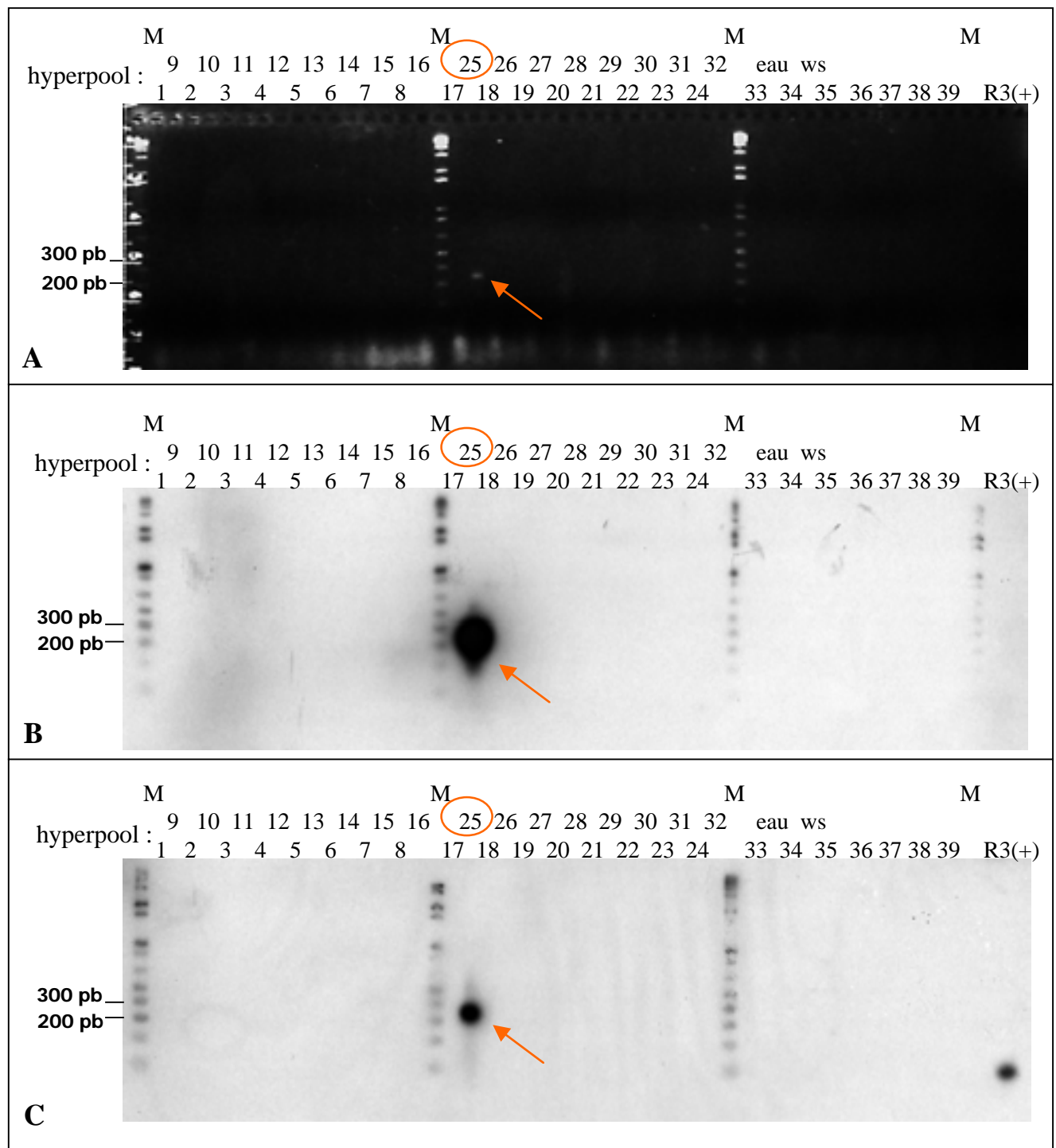


droite (RB). Les produits de PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose à 2 %, puis transférés simultanément sur deux membranes de nylon. Ces membranes ont été hybridées séparément avec un mélange de deux sondes correspondant aux bordures droite et gauche de l'ADN-T et avec une sonde spécifique de *AtTOR* dans le but d'éliminer les faux positifs générés lors des PCR. Nous avons réalisé ces différentes étapes avec les amorces TOR 7, TOR A, TOR D, TOR R2, TOR R3, TOR R4 et TOR R5 (Tab. 1) qui avaient préalablement été testées pour ne rien amplifier en couple avec les amorces TAG3 ou Tag5 à partir d'ADN génomique sauvage. Les différentes étapes sont présentées dans la figure 26 pour l'amorce TOR R3 qui a donné un résultat positif en PCR confirmé par hybridation avec les sondes correspondant aux bordures de l'ADN-T et avec la sonde TOR D/R3.

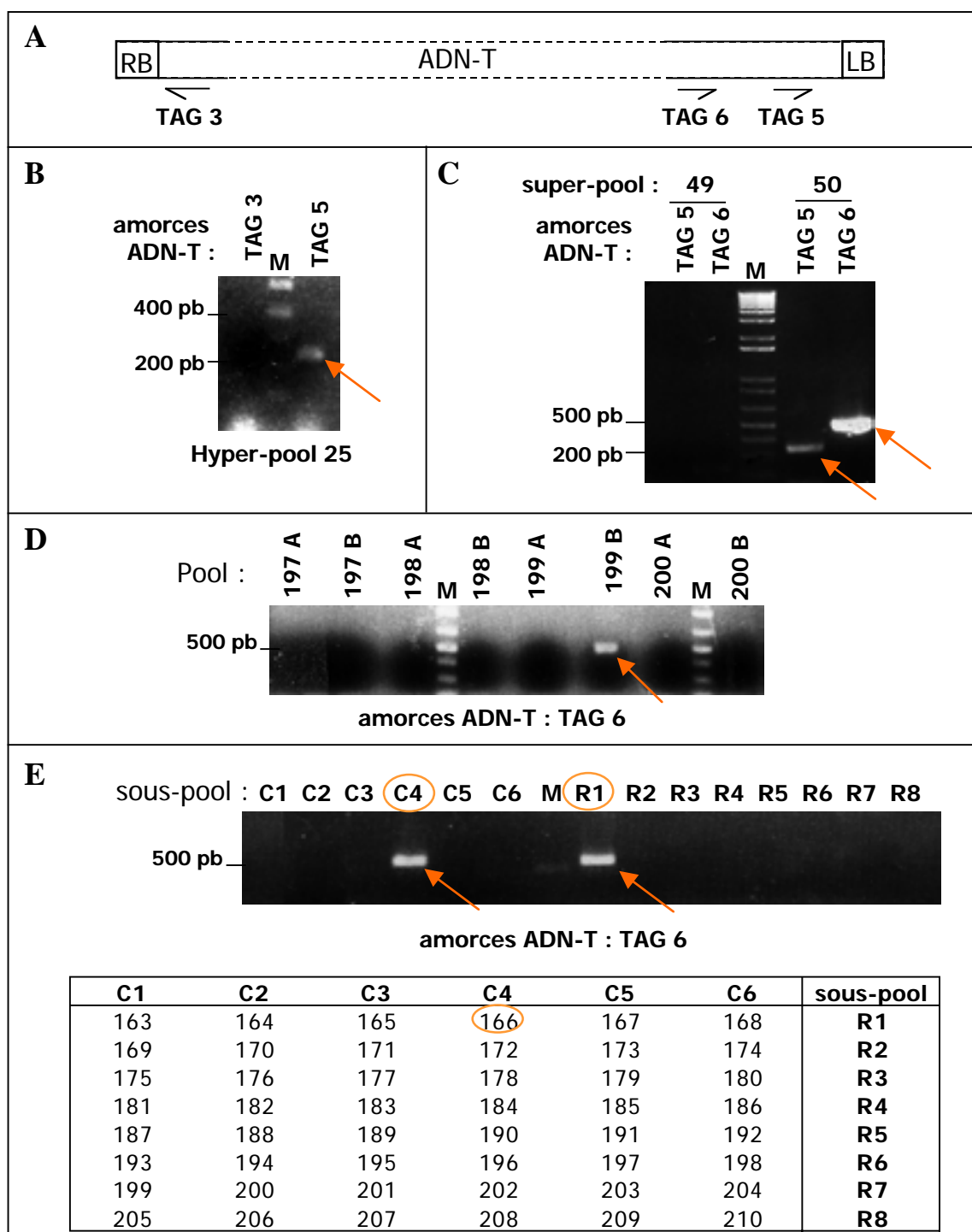
Plusieurs étapes ont ensuite été nécessaires pour isoler la lignée contenant cette insertion parmi celles qui composent l'hyper-pool 25 et pour identifier le site d'insertion de l'ADN-T dans *AtTOR* et (Fig. 27). Dans un premier temps, les deux produits de PCR sur l'hyper-pool 25 obtenus avec les amorces TAG 3 et TAG 5, qui avaient été mélangés lors du crible, ont été analysés séparément (Fig. 27B). Cela a permis d'identifier l'amorce TAG 5 comme celle qui a donné le signal positif. Des PCR ont ensuite été réalisées avec les deux super-pools composant l'hyper-pool 25, puis avec les pools composant le super-pool positif, et enfin à partir de l'ADN génomique des lignées composant le pool positif (Fig. 27C à E). La lignée contenant l'insertion de l'ADN-T dans *AtTOR* a ainsi pu être isolée (lignée EAL 166). L'ADN amplifié par PCR à partir du super-pool 50 avec les amorces TAG 6 et TOR R3 (Fig. 27C) a été purifié sur gel d'agarose. Son séquençage a montré que l'ADN-T est inséré dans le début de l'exon 41, 13212 paires de bases en aval du site d'initiation de la transcription, ce qui correspond à l'acide aminé 1821 de *AtTOR* en amont du domaine FRB (Fig. 28A).

### 1.1.2 Analyse de l'insertion de l'ADN-T dans le mutant *tor-2*

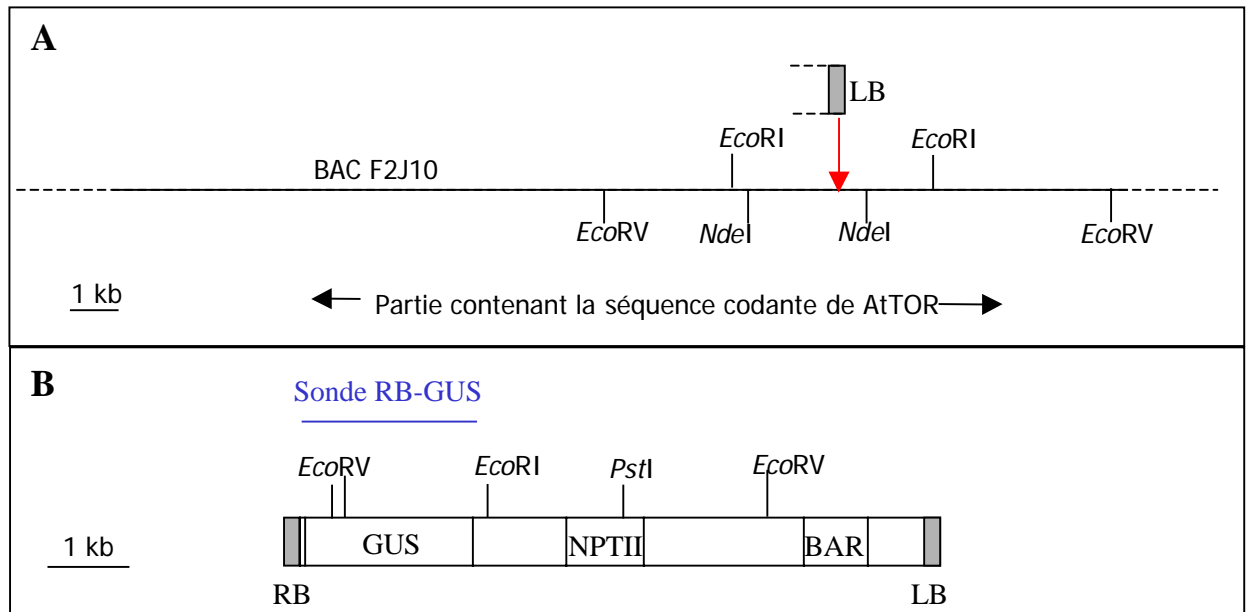
La lignée EAL166 ségrège 66 descendants résistants à la kanamycine pour 7 descendant sensibles. Cette ségrégation suggère qu'il y a plusieurs insertions de l'ADN-T dans cette lignée (la ségrégation est de 3 résistants pour 1 sensible dans le cas d'une insertion simple). Le nombre d'insertions de l'ADN-T dans le mutant EAL166 a été analysé par la méthode de Southern, après digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI*, en utilisant une sonde RB-GUS couramment utilisée au laboratoire pour l'étude des mutants (Fig. 28 et 29). Cette analyse a révélé la présence de sept bandes alors qu'une insertion simple ne doit donner qu'une seule bande. Trois de ces sept bandes ont pu être éliminées lors de croisements avec des plantes sauvages (rétro-croisement) ce qui montre qu'elles ne sont pas ou peu liées génétiquement à l'insertion dans *AtTOR* (Fig. 29). Les quatre bandes restantes ne ségrègent pas après trois retro-croisements, ce qui indique une



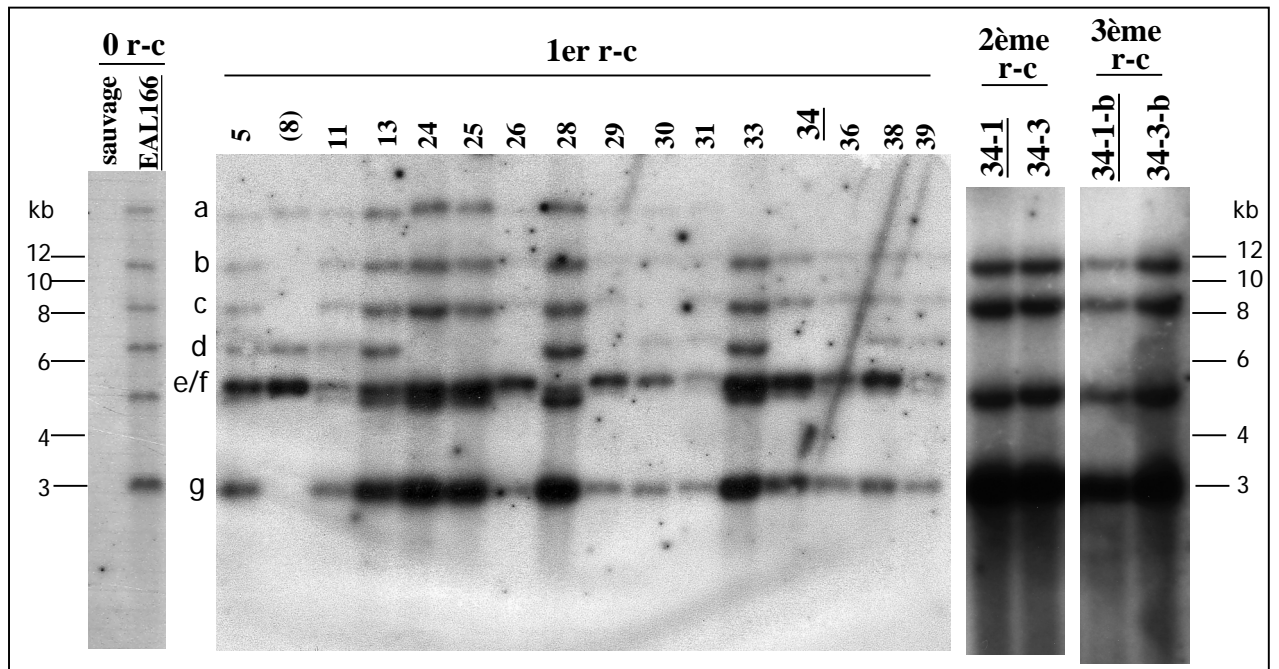
**Figure 26 : résultats obtenus lors du crible de mutants d'insertion d'ADN-T par PCR avec l'amorce TOR R3.** A, électrophorèse des produits de PCR sur ADN des super-pools. Les PCR avec les amorces TOR R3 et TAG 3, et TOR R3 et TAG 5 ont été réalisées séparément et réunies dans les mêmes puits pour l'électrophorèse. Chaque puits correspond donc à un hyper-pool et deux couples d'amorces. B et C, hybridation avec un mélange de sondes correspondant aux bordures droite et gauche de l'ADN-T (B) et une sonde TOR D/R3 (Fig. 18) (C) du gel photographié en A transféré sur membrane de nylon. La flèche orange indique la bande positive et les signaux d'hybridation positifs correspondants. M : marqueur de taille moléculaire.



**Figure 27 : Identification de la lignée du super-pool 25 contenant l'insertion de l'ADN-T dans *AtTOR*.** **A**, position sur l'ADN-T des amorces utilisées. **B**, électrophorèse séparée des PCRs sur l'ADN de l'hyper-pool 25 réalisées avec les amorces TAG 3 et TAG5. **C**, électrophorèse des PCRs réalisées sur l'ADN des deux super-pools constituant l'hyper-pool 25. La différence de mobilité observée avec les amorces TAG 5 et TAG 6 confirme la présence d'une insertion de l'ADN-T dans *AtTOR* au sein du super-pool 50. Le fragment obtenu avec la sonde TAG 6 a été purifié et séquencé afin d'identifier le site d'insertion de l'ADN-T dans *AtTOR*. **D**, électrophorèse des PCRs réalisées pour identifier le pool positif parmi les 8 pools constituant le super-pool 50. **E**, électrophorèse réalisée afin d'isoler la lignée portant l'insertion dans *AtTOR* parmi les 48 lignées (numérotées 163 à 210) du pool 199 B. Les ADN génomiques des plantes de chaque lignée ont été extraits séparément puis réunis en sous-pools pour les PCRs, comme indiqué dans le tableau. la lignée positive est identifiée par le fait que son ADN est inclu dans les deux sous-pools positifs. Les flèches oranges indiquent les puits positifs, c'est à dire ceux ou une bande de taille attendue est détectée. RB, extrémité droite de l'ADN-T ; LB, extrémité gauche de l'ADN-T.



**Figure 28 :** position, sur *AtTOR* (A) et sur l'ADN-T (B), des sites de restriction et des sondes utilisés pour les analyses de l'insertion de l'ADN-t dans *tor-1* par la méthode de Southern. La flèche rouge indique le site d'insertion de l'ADN-T dans *tor-2*. Il n'y a pas de site *NdeI* dans l'ADN-T.



**Figure 29 :** analyse par la méthode de Southern avec une sonde RB-GUS (T-DNA) de l'ADN de mutants EAL166 rétro-croisés digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Les rétro-croisements sont réalisés à partir de plantes mutantes hétérozygotes pour l'insertion dans *AtTOR* car cette mutation est associée à un phénotype embryon-létal (décrit dans l'article 1). Les lignées ont été testées pour la présence de l'insertion dans *AtTOR* par PCR avec les amorces R3 et TAG5, et pour le phénotype embryon-létal (présence d'un quart de graines avortées dans les siliques). Seule la lignée EAL166-8 a donné un résultat négatif pour le test PCR et n'a pas de graines avortées dans ses siliques. Les bandes a, d et f disparaissent dans certaines lignées portant l'insertion dans *AtTOR* (lignées 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34, 36, 38 et 39), ce qui montre que ces bandes ne sont pas ou peu liées génétiquement à cette insertion. De plus, les bandes a, d et f sont visibles chez la lignée 8 qui n'a pas l'insertion dans *AtTOR*. La lignée EAL166-34 a été choisie pour le second rétro-croisement car elle fait partie des lignées issues du premier rétro-croisement qui ont le moins de bandes (à l'exception de EAL-8 qui n'a pas l'insertion dans *AtTOR*). Aucune de ces bandes (b, c, e et g) n'a d'ailleurs été éliminée lors des deux autres rétro-croisements. La lignée EAL166-34-1-b a été choisie pour les analyses ultérieures et sera nommée *tor-2*. r-c, rétro-croisement.

liaison génétique avec le locus *AtTOR* dans ce mutant (Fig. 29, lignes 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> r-c). L'une des lignées rétro-croisées trois fois a été sélectionnée et sera désignée *tor-2* dans la suite de ce manuscrit. Cette lignée ségrège 2:1 pour la résistance à la kanamycine ce qui suggère que les fragments d'ADN-T restants sont liés génétiquement (la ségrégation 2 :1 au lieu de 3 :1 s'explique par le phénotype embryon-letal lié à l'insertion dans *AtTOR* ; voir Article 1). L'insertion de l'ADN-T a ensuite été analysée par la méthode de Southern en utilisant 3 autres enzymes de restriction mais toujours avec la sonde RB-GUS (Fig. 30). Cela confirme la présence d'une insertion complexe de l'ADN-T. La présence d'une bande à 1,2 kb avec l'enzyme *EcoRV* suggère une jonction RB-RB entre deux ADN-T.

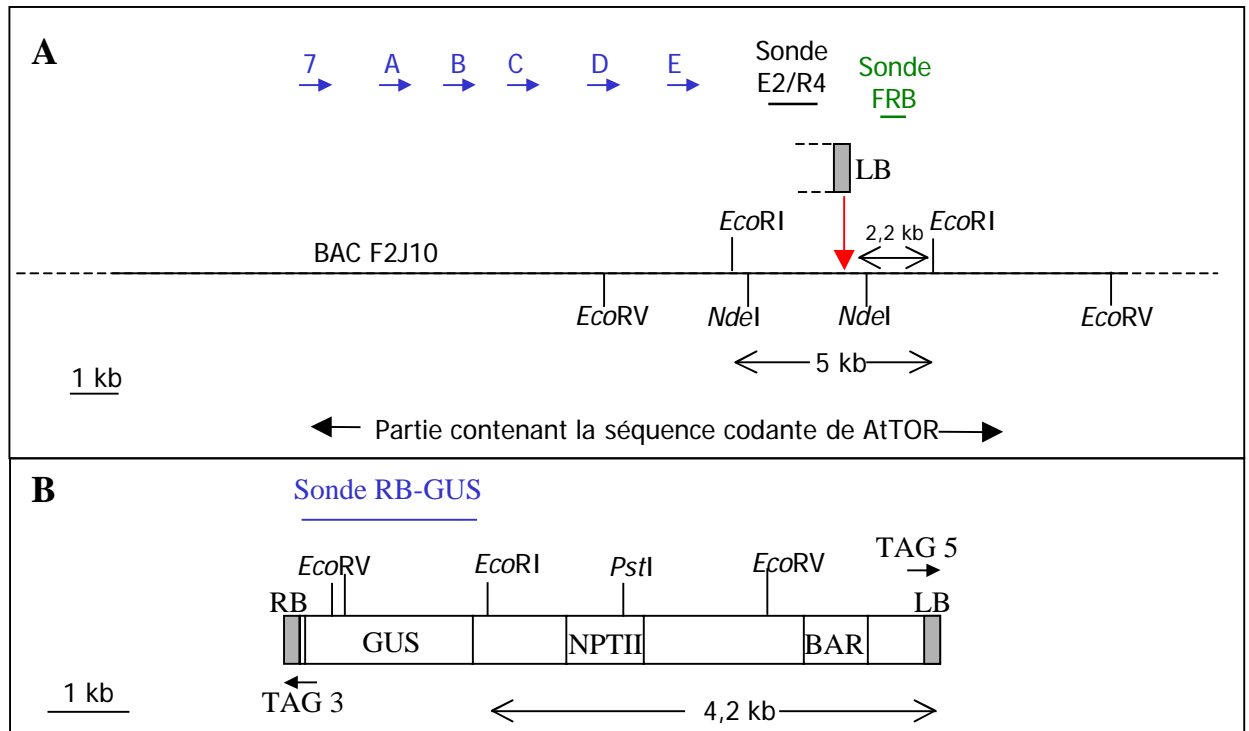
Afin de mieux caractériser l'insertion de l'ADN-T dans *AtTOR*, un transfert de Southern a été réalisé, après digestion par l'enzyme *EcoRI*, avec la sonde FRB située sur *AtTOR* en aval du site d'insertion de l'ADN-T (Fig. 28Bis et 31). Une bande supplémentaire est observée chez le mutant *TOR/tor-2* par rapport au sauvage. Cette bande (environ 6,5 kb) résulte vraisemblablement d'un ou plusieurs ADN-T dans cette région du gène *AtTOR*.

Des PCR ont été réalisées afin de déterminer l'autre borne de l'insertion dans *AtTOR*. Cependant, aucun fragment d'ADN n'a pu être amplifié à partir d'ADN de la lignée *TOR/tor-2* en utilisant l'amorce TAG 3 (RB ; Fig. 28Bis) avec des amorces situées dans *AtTOR* à des distances allant de 3 kb à 13 kb en amont du site d'insertion (amorces TOR E, TOR D, TOR C, TOR B, TOR A et TOR 7, Tab. 1 et Fig. 28Bis). Cela suggère que l'insertion du (des) ADN-T dans *AtTOR* est complexe. On peut proposer trois hypothèses ; qu'une délétion de plus de 13 kb ait eu lieu, que ce n'est pas le RB qui fait la jonction avec l'ADN génomique ou que le gène *AtTOR* a subi un réarrangement en amont de l'insertion.

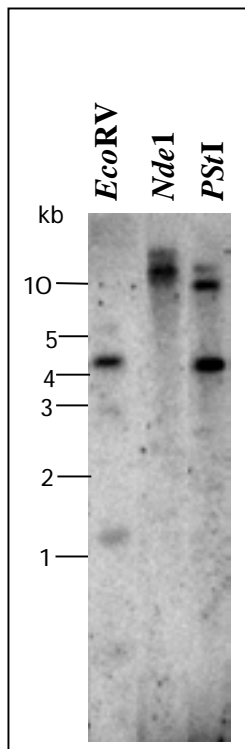
L'insertion de l'ADN-T au niveau du locus *AtTOR* a alors été analysée par la méthode de Southern en utilisant la sonde TOR E2/R4 localisée en amont du site d'insertion de l'ADN-T (Fig. 32). Le profil obtenu avec trois enzymes de restrictions coupant *AtTOR* en amont de la sonde E2/R4 et en aval de l'insertion de l'ADN-T est identique à celui obtenu avec du sauvage. Les bandes observées correspondent donc à l'allèle sauvage de *AtTOR*, l'ADN génomique ayant été extrait à partir de plantes hétérozygotes pour la mutation. D'autres bandes auraient été visibles si l'extrémité non séquencée de l'ADN-T avait été insérée dans *AtTOR* à proximité de la jonction séquencée. Ainsi, une partie du gène *AtTOR* a été éliminée en amont du site d'insertion séquencé.

### 1.1.3 Obtention d'un second mutant de *AtTOR*

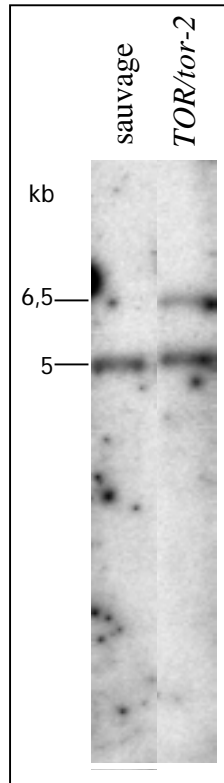
Un second mutant, appelé *tor-1* a été isolé au Laboratoire du Métabolisme Carboné lors d'un crible de mutants de la collection de Versailles exprimant le gène rapporteur *GUS* au niveau



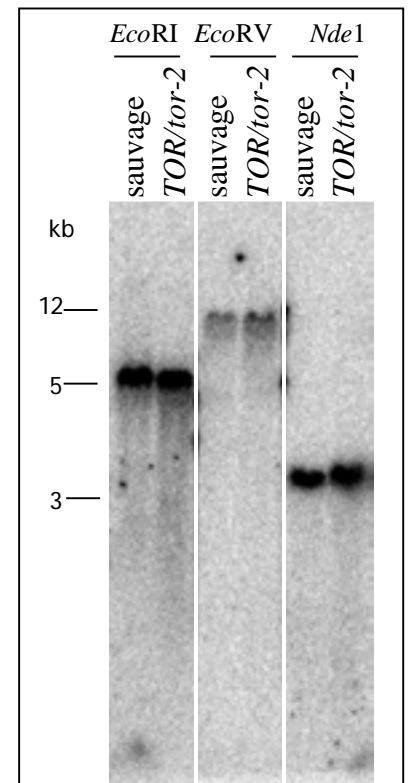
**Figure 28 bis :** position, sur *AtTOR* (A) et sur l'ADN-T (B), des sites de restriction et des sondes utilisés pour les analyses de l'insertion de l'ADN-t dans *tor-1* par la méthode de Southern. La flèche rouge indique le site d'insertion de l'ADN-T dans *tor-2*. Il n'y a pas de site *NdeI* dans l'ADN-T. Les flèches bleues indiquent les amorces TOR utilisées pour les PCR avec TAG3.



**Figure 30 :** analyse d'ADN de la lignée *tor-2* par transfert de Southern avec une sonde RB-GUS.



**Figure 31 :** analyse d'ADN de la lignée *tor-2* (comparée au sauvage) par transfert de Southern avec la sonde FRB.



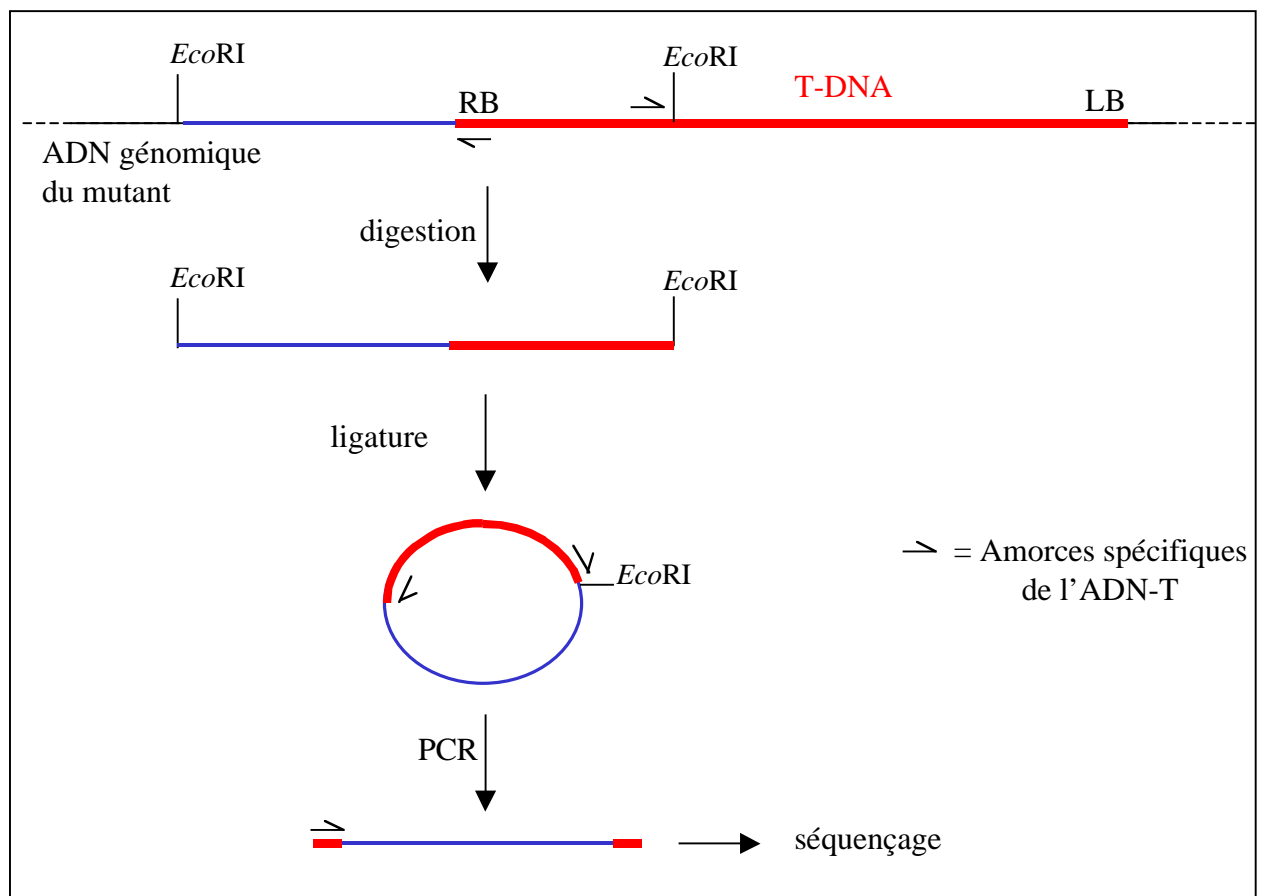
**Figure 32 :** analyse d'ADN de la lignée *tor-2* (comparée au sauvage) par transfert de Southern avec une sonde TOR E2/R4. Aucun polymorphisme de taille des fragments de restriction n'est observé.

des racines. Ce crible a pour but d'identifier des gènes impliqués dans la mise en place de l'architecture racinaire (Sarrobort *et al.*, 2000). L'ADN flanquant l'ADN-T de ces mutants est systématiquement amplifié puis séquencé à l'aide de la technique de PCR inverse (Fig. 33 ; Earp *et al.*, 1990). Une insertion dans le gène *AtTOR* a été détectée dans l'un de ces mutants (*tor-1*). Cette première séquence a permis d'obtenir la jonction entre la bordure droite de l'ADN-T et le gène *AtTOR*. La jonction entre la bordure gauche a ensuite été amplifiée avec les amorces TAG 5 et R3. L'insertion est située dans le début de l'exon 37, 12004 paires de bases en aval du site d'initiation de la transcription, ce qui correspond à l'acide aminé 1555 de AtTOR.

La suite de l'analyse des mutants *tor-1* et *tor-2* est présentée sous forme d'un article qui a été accepté pour publication par la revue *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.

## **1.2 Article 1 : Expression and disruption of the *Arabidopsis TOR* (Target of Rapamycin) gene**

L'article débute par une description rapide de l'analyse moléculaire de *AtTOR* qui a été détaillée dans le chapitre précédent. Ensuite, une expérience de double hybride montre que le domaine FRB de AtTOR est capable d'interagir avec la rapamycine et le FKBP12 de *S. cerevisiae* (ScFKBP12). L'analyse du phénotype des mutants *tor-1* et *tor-2* est ensuite présentée en détail. D'autre part, le profil d'expression de *AtTOR* a été analysé précisément à l'aide d'une fusion traductionnelle entre *AtTOR* et le gène rapporteur *GUS* présente dans le mutant *tor-1*.



**Figure 33 : stratégie utilisée pour le séquençage systématique des séquences flanquant l'insertion de l'ADN-T dans l'ADN des mutants de la banque de l'INRA de Versailles.** Cette stratégie appelée PCR inverse consiste à couper l'ADN génomique du mutant avec une enzyme de restriction (*EcoRI*) qui coupe dans l'ADN-T, puis à ligaturer les fragments sur eux mêmes et à amplifier la séquence flanquant l'ADN-T avec des amorces spécifiques de l'ADN-T (flèches). Ce travail est réalisé de façon systématique sur les mutants exprimant le gène rapporteur *GUS* dans les racines au Laboratoire de Métabolisme Carboné par Pascale David et Laurent Nussaume.



# Expression and disruption of the *Arabidopsis TOR* (Target of Rapamycin) gene

Benoît Menand<sup>\*</sup>, Thierry Desnos<sup>\*</sup>, Laurent Nussaume<sup>\*</sup>, Frédéric Berger<sup>†</sup>, David Bouchez<sup>‡</sup>,  
Christian Meyer<sup>§</sup> and Christophe Robaglia<sup>\*¶</sup>

<sup>\*</sup> Laboratoire du Métabolisme Carboné, DEVM, Commissariat à l'Energie Atomique, Cadarache, France.

<sup>†</sup> RDP, UMR 5667, Ecole National Supérieure de Lyon, France.

<sup>‡</sup> Station de Génétique et Amélioration des Plantes, <sup>§</sup> Unité de Nutrition Azotée des Plantes, Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France.

<sup>¶</sup> Corresponding author: Christophe Robaglia, Laboratoire du Métabolisme carboné, DEVM, CEA/Cadarache, 13108 St Paul lez Durance, France; e-mail: robaglia@cea.fr; fax: (33) 4 42 25 46 56.

Abbreviations: TOR, target of rapamycin; FRB, FKBP-rapamycin binding domain of TOR; FKBP12, 12kDa FK506-binding protein; S6K, ribosomal protein S6 kinase; eIF, eucaryotic initiation factor; 4E-BP1, eIF4E-binding protein 1; GUS,  $\beta$ -glucuronidase.

## ABSTRACT

TOR (Target of rapamycin) protein kinases were identified in yeasts, mammals and *Drosophila* as central controllers of cell growth in response to nutrient and growth factors. Here we show that *Arabidopsis thaliana* possesses a single *TOR* gene encoding a protein able to

complex with yeast FKBP12 and rapamycin despite the insensitivity of *Arabidopsis* vegetative growth to rapamycin. Analysis of two T-DNA insertion mutants shows that disruption of *AtTOR* leads to the premature arrest of endosperm and embryo development. A T-DNA mediated translational fusion of *AtTOR* with the *GUS* reporter gene allows to show that *AtTOR* is expressed in primary meristem, embryo and endosperm, but not in differentiated cells. The implications of these features for the plant TOR pathway are discussed.

## INTRODUCTION

TOR proteins are large eucaryotic proteins belonging to the family of the phosphatidylinositol 3-kinase related kinases (1). Despite having a kinase domain related to phosphatidylinositol 3-kinase, TOR proteins are thought to be protein kinases. TOR proteins are the targets of the anti-proliferative drug rapamycin produced by the bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (1). Their inactivation by rapamycin is mediated by formation of a ternary complex where rapamycin forms non-covalent links between the peptidyl-prolyl isomerase FKBP12, and the FKBP-rapamycin binding domain (FRB) of TOR proteins (2). In *Saccharomyces cerevisiae*, two *TOR* genes named *TOR1* and *TOR2*, have been identified in a screens for mutants resistant to rapamycin (3; 4; 5). They modulate cell growth in relation to nutrient availability and are functionally redundant for the regulation of protein synthesis necessary for the G1 to S progression in the cell cycle. This regulation occurs by activation of the translation initiation complex eIF4F and of RNA polymerases I and III (1). Others TOR functions were also described in the budding yeast where TOR1 and TOR2 control the regulation of nutrient metabolism by sequestering transcription factors in the cytoplasm and TOR2 is involved in organisation of the actin cytoskeleton (1). Two *TOR* genes have been recently characterised in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* where the situation is different than in *S. cerevisiae*, since SpTORs proteins are not redundant and are both resistant to rapamycin. SpTOR2 is essential for growth, whereas SpTOR1 is required for response to nitrogen starvation and stresses (6). A mammalian TOR, named mTOR (or FRAP/RAFT/RAPT) has also been identified (7, 8, 9). It activates protein synthesis in response to nutrient and growth factors through at least two ways; one is the activation of capped mRNA translation, through the deactivation of the eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) which sequestrates the initiation factor eIF4E, and the other is the activation of translation by activation of the 40S ribosomal protein S6 kinase S6K1 (also named p70<sup>S6K</sup>) (1). In *Drosophila*, which possess a single TOR gene, overexpression of dS6K was found to rescue the viability of leaky TOR mutants arrested at the pupal stage (10).

Several observations suggest that nutrient perception is a major effector of TOR activation. Firstly, *Drosophila dTOR* mutant cells have a phenotype similar to those which are starved (i.e. nucleolar size decreasing, fat body vesicle formation and endoreplicative cell cycle

arrest) (10). Secondly, in the budding yeast and in mammalian cells, rapamycin triggers the autophagy process, a typical starvation response (1). Finally, in mammalian cells, rapamycin blocks the amino acid-dependent phosphorylation of S6K1 and 4E-BP1 proteins, two downstream targets of TOR (1).

The phylogenetic conservation of the TOR pathway in both yeast and animals and its central role in regulating cell growth as a function of nutrient availability, suggest that it may be conserved in all eucaryotes including plants. Plant growth is a result of cell growth coupled to cell division, and of cell expansion. In specialised zones, the meristems, cell growth and division occur to produce the new tissues and organs. Post-mitotic differentiated cells can reach large sizes, such as in the hypocotyl or in mature leaves and roots. Meristem activity and embryonic development depend on the availability of nutrients provided by other parts of the plant. There is very little knowledge on the perception and integration of nutrient supplies at the level of dividing embryonic and meristematic cells. As coordination of nutrient sensing with cell growth and division is a very basic requirement, it probably involves evolutionary conserved pathways on which new functions were added during the ecophysiological history of organisms. The specific nutritional capacities of plants, such as carbon autotrophy, make them attractive models for the comparative molecular genetics of these regulations. The TOR pathway can play an important role in the generation of the form of multicellular organisms during embryonic and adult development by relaying the perception of nutrients furnished by source tissues into growing (sink) zones. With this in mind, we undertook an analysis of the TOR pathway in *Arabidopsis thaliana*..

This work describes the identification, the functional analysis by reverse genetics and the pattern of expression of *AtTOR*, the single *Arabidopsis* homolog of animal and yeast TORs.

## MATERIALS AND METHODS

### Molecular biology

The entire *AtTOR* coding sequence was reverse transcribed from 1 µg of total RNAs from WT roots (ecotype Columbia) with AMV RT (Roche Molecular Biochemicals) and primer TOR-R1 (5'-GCGGCCGCAAATGCAAATTAGTTGA-3'). The RT product was amplified by PCR (9 min of elongation) with the Expand Long Template System (Roche Molecular Biochemicals) and primers TOR R1 and TOR 7 (5'-CCTGCATCCATGGCTTCCCCTTC-3'). The PCR product was cloned into the pCR-XL-TOPO vector (Invitrogen). A cDNA clone was entirely sequenced and discrepancies with the genomic sequence and other partially sequenced clones were corrected by replacing restriction fragments.

The 5' end of the *AtTOR* transcript was defined by 5' RACE (Gibco BRL) using 1.9 µg of root total RNA and primer 5'-GCCGGTATTCTTAACACAGTAAGAA-3' as the gene specific primer. A 500 bp product from a nested PCR was cloned into pGEM-T-easy vector (Promega) and sequenced.

Sequence alignments were performed with the GENESTREAM software of the Institut de Génétique Humaine, Toulouse, France (<http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>). The Swissprot accession number are P42345 (mTOR/FRAP), P35169 (TOR1) and P32600 (TOR2). dTOR Genpept accession number is AAF53237.

The TOR-FRB probe (722 pb) used for Southern blot was PCR amplified from wild type ecotype WS genomic DNA, with primers 5'-AGGGTTGCCATACTTTGGCATG-3' and 5'-GGCTAGCTGTTTGTCAATCCG-3'. The GUS probe is a 2,4 kb *XbaI-SacI* fragment from the pGKB5 vector, corresponding to the right border and the GUS gene (11).

### Two-hybrid experiments

*Saccharomyces cerevisiae* strain SMY87-4 (MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 ade2 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ fpr1::hisG*), a gift from J. Heitman, was used for two-hybrid experiments with rapamycin. This strain is a derivative of the

two-hybrid host strain PJ69-4A in which the FKBP12-encoding gene was disrupted (12). SMY87-4 cells were co-transformed with 3 plasmids: pTR17 (URA3) (13) to express a dominant rapamycin resistant allele of the TOR2 gene (TOR2-1), the plasmid containing the GAL4(BD)::AtFRB (TRP1) fusion, and the plasmid carrying the appropriate FKBP12 fused to GAL4(AD) (LEU2). After selection for the presence of the three plasmids, co-transformed yeast strains were grown overnight, resuspended in top agar (0,7% Agar in water) and spread on solid medium lacking leucine, tryptophan, uracil and adenine. Rapamycin (1 µg diluted in 10% tween-20 / 90% ethanol) or dilution solution alone were deposited on Whatman paper discs, on the surface of the agar, and cells were incubated at 30°C for 5 days. To construct the plasmid expressing the GAL4(AD)::AtFRB fusion, the AtFRB sequence (corresponding to amino acid residue 1851 to 2050 of AtTOR) was PCR amplified from EST W43444 with primers 5'-CCGAATTCAATACATTCTAATAATCGTGCTG-3' and 5'-CCGCGGCCGCAGGAAGTCA-3', and inserted downstream of the GAL4(BD) in pBI880 (14). The plasmid expressing the GAL4(AD)::ScFKBP12 fusion was obtained by subcloning the *ScFKBP12* coding sequence excised from pSBH1 (15) into pBI880 (14).

### **Plant material and growth conditions**

The T-DNA insertion mutants are in the Wassilewskija (WS) ecotype (11, 16). Plants were grown in a phytotron at 25°C under a 8 h light/16 h dark regime (23°C/18°C). For GUS staining in roots, plants were grown in vitro with the same photoperiod, on two fold diluted Hoagland solution with 0,7% agar and 50 µg/mL of kanamycin. To produce callus, lacerated leaves were transferred on solid Gamborg B5 medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0,5 mg/L), kinetin (0,05 mg/L) and sucrose (20 g/L).

### **Staining, binocular optics and microscopy**

For embryo, immatures siliques were dissected under binocular optics and seeds were cleared in Hoyer's solution (7.5 g arabic gum, 100 g chloral hydrate and 5 mL glycerin in 30 mL water) and observed under Nomarsky optics. For high resolution pictures, seeds were stained with Feulgen/LR White method as described (17) and observed with a Zeiss confocal

microscope (LSA510) at an exciting wavelength of 488 nm and an emission with a long-pass filter 510 nm.

GUS staining was performed as described (18) with a 4 h incubation at 37°C. For seeds staining, opened young siliques were incubated 1 h in 90% acetone (-20°C) followed by two 1 h vacuum infiltration in ferri-ferrocyanide solution (4 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 4 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 100 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0) and addition of the coloration solution (4 mM X-Gluc, 10 mM EDTA, 0,1% triton, 100 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0) before a 14 h incubation at 37°C. Seeds were dissected from siliques and placed in Hoyer's solution. Observations were performed with a Leica MZ FL3 binocular for Leaves, flowers and callus, and with a Leica DMRXA microscope for roots and seeds.

## RESULTS

### Molecular characterisation of *AtTOR*.

In a quest for plant homologs of the mammalian *mTOR/FRAP* and yeast *TOR* (*TOR1* and *TOR2*) genes, an *Arabidopsis* Expressed Sequence Tag (acc: W43444; clone id: G11H10T7) was identified bearing similarities with the C-terminal part of mammalian and yeast TOR proteins, including the kinase domain. Sequencing of the 2,5 kb cDNA fragment has further confirmed the close relationship of this encoded amino acid sequence with those of TOR proteins (49 % similarity with amino acid residues 1702 to 2249 of mTOR and 1659 to 2474 of TOR2) and reveals the presence of a domain similar to the FRB domain which is a hallmark of mammalian and yeast TORs. Considering this high degree of similarity with known TOR proteins the protein corresponding to this EST was considered as an homolog of mammalian and yeast TORs and named *AtTOR*, for *Arabidopsis thaliana* TOR.

The *Arabidopsis TOR* gene was found to map on the lower arm of chromosome 1. Most of the *AtTOR* genomic sequence was obtained from BAC F20C18 (acc: B18861). However, since F20C18 was truncated at the 3' end of *AtTOR*, the remaining of the genomic sequence was obtained from DNA fragments amplified by PCR with primers derived from the EST cDNA sequence. The *AtTOR* genomic sequence was later found in BAC F2J10 (gene F2J10.9, acc:

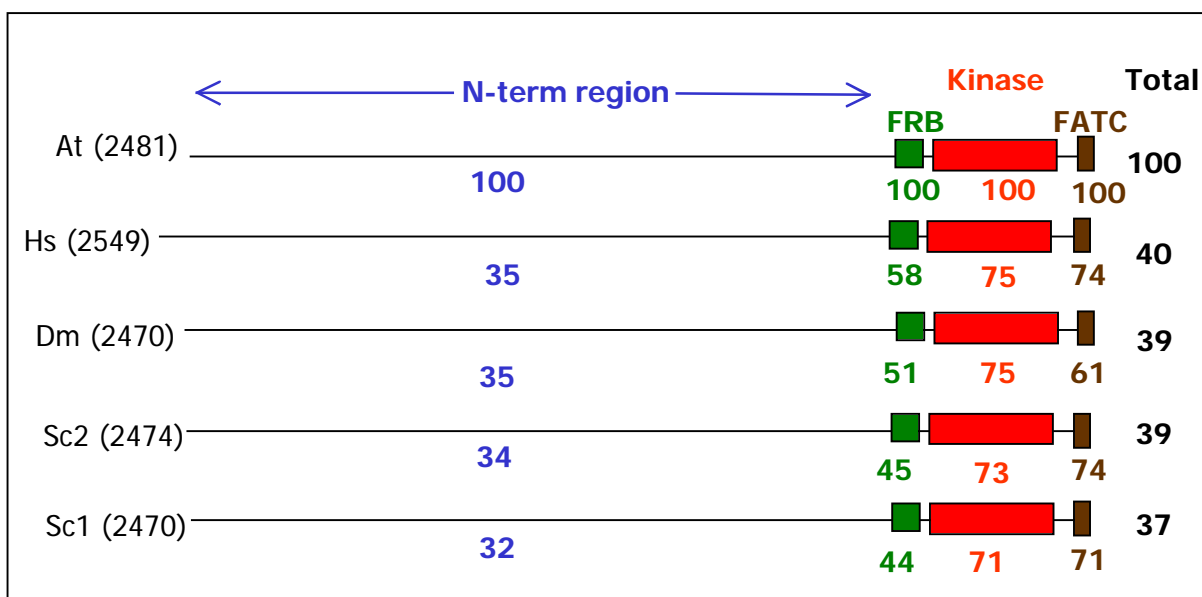
AC015445). Southern blot hybridization (data not shown and Fig. 3A, first lane) and searches in the complete *Arabidopsis* genomic sequence show that *AtTOR* is a unique gene in this species. Using primers derived from the genomic sequence, a partial 7.4 kb cDNA was cloned by RT-PCR. A 5' RACE experiment allowed to identify an additional 300 bp upstream cDNA fragment containing an upstream ORF (2 codons) in the 5' mRNA leader. The cDNA sequence was compared with the genomic sequence and errors introduced during the RT-PCR were corrected by replacing restriction fragments by others obtained from independent PCR reactions and carrying no mutations. The final assembly was then entirely resequenced and deposited into GenBank (acc: AF178967). The comparison of the genomic and the cDNA sequences revealed that *AtTOR* contain 56 exons and 55 introns and that the *AtTOR* gene spans at last 17kb of genomic DNA.

The AtTOR protein sequence deduced from the cDNA sequence contains 2481 amino acids residues with a predicted molecular weight of 279 kDa. Alignment of AtTOR with TOR protein sequences from others organisms (Fig. 1) shows a high degree of conservation of the FRB and kinase domains as well as in a short C-terminal domain named FATC which is conserved in the phosphatidylinositol 3-kinase related kinases FRAP, ATM and TRRAP (1). Highly conserved stretches of amino acids are also present throughout the N-terminal two thirds of the sequence, presumably reflecting functional or structural conservations. This part of AtTOR contains 12 motifs (20 to 40 residues), named HEAT repeats (found in Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) that are found in all TOR proteins and have been proposed to be involved in proteins interactions (1). Protein sequences alignments also show that mTOR is the closest homolog of AtTOR (Fig. 1) and that AtTOR is closer to TOR2, the yeast TOR protein involved in cytoskeleton organisation (1), than to TOR1 (Fig. 1).

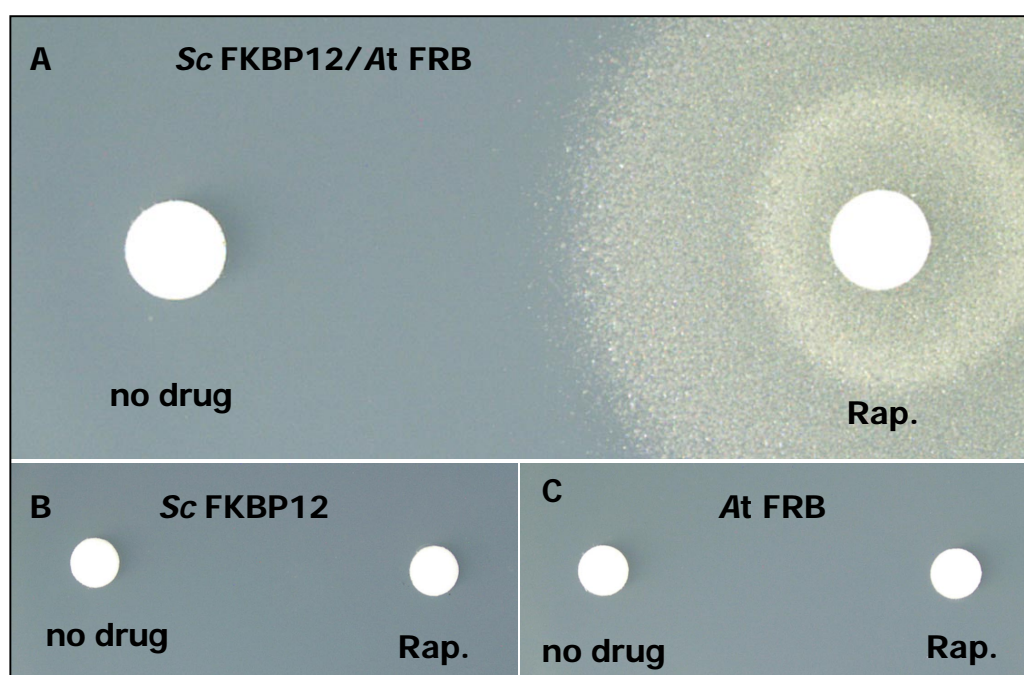
### **AtTOR binds yeast FKBP12 in the presence of rapamycin.**

Structure determination of the human FKBP12-rapamycin-FRB complex shows that there are extensive rapamycin-protein interactions and relatively few interactions between FKBP12 and FRB (2). To confirm that the cloned cDNA was coding for a functional TOR protein, rapamycin dependent FKBP12 binding was examined using a yeast two-hybrid system (12, 13). SMY87-4 yeast cells containing a plasmid borne rapamycin resistant version of TOR1, deleted





**Article 1, figure 1.** Comparison of the AtTOR protein sequence to the TOR protein sequences from other organisms. Each value indicates the percentage of identity with the corresponding domain sequence of AtTOR. In AtTOR, the FRB, Kinase and FATC domains correspond to residues 1930 to 2022, 2092 to 2340 and 2451 to 2481 respectively. At, *Arabidopsis thaliana*; Hs, *Homo sapiens*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc1 for TOR1 and Sc2 for TOR2); Dm, *Drosophila melanogaster*. The number of amino acid residues of each protein is in brackets.



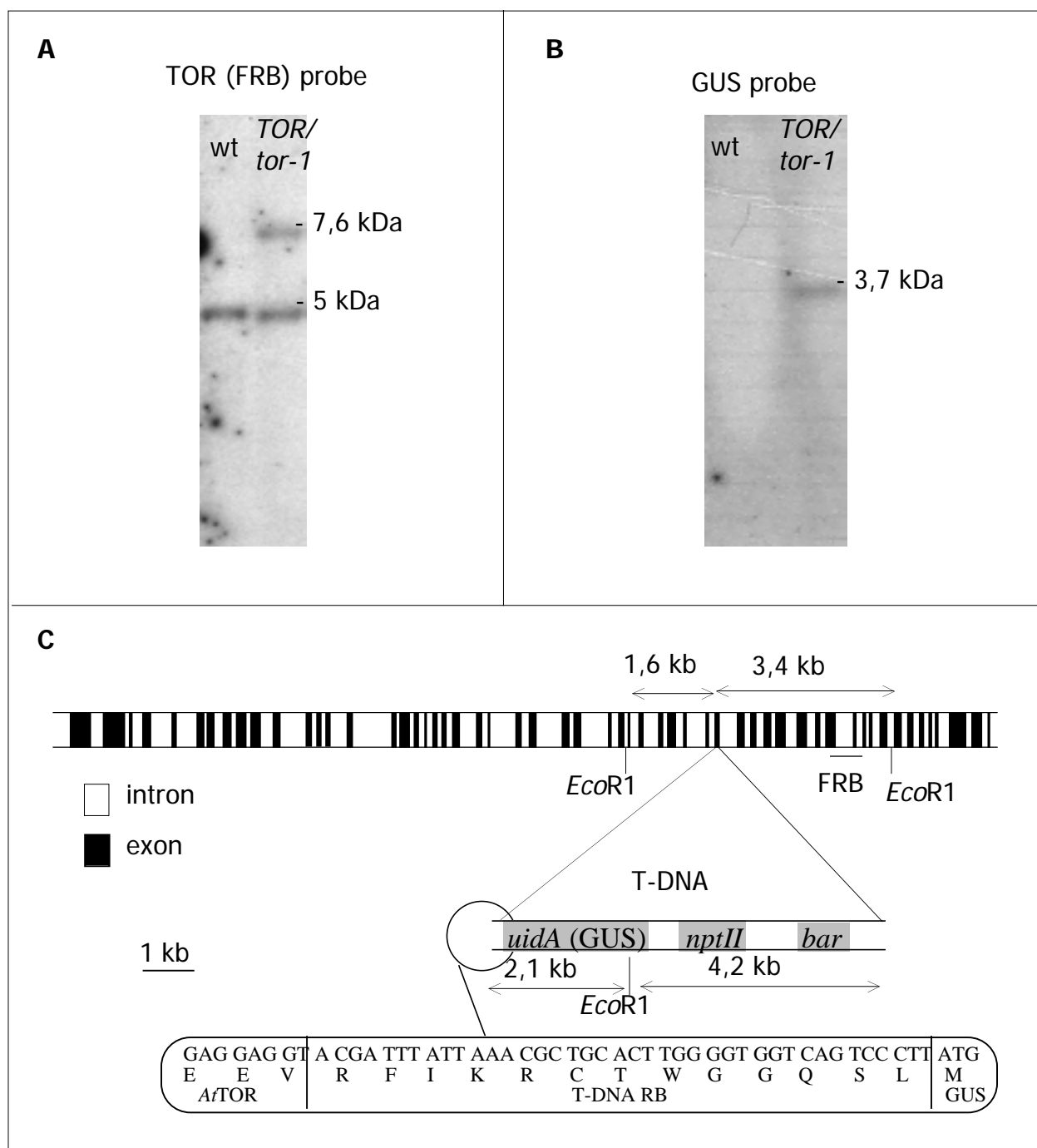
**Article 1, figure 2.** Yeast two-hybrid assay showing that AtTOR FRB domain is able to form a complex with rapamycin and ScFKBP12. (A) Two-hybrid strain SMY87-4 co-expressing the GAL4(BD)::AtFRB and the GAL4(AD)::ScFKBP12 fusion proteins was spread on medium lacking adenine. Formation of the FKBP12-rapamycin-FRB complex induces expression of the *GAL-ADE2* reporter gene and is revealed by growth around the rapamycin (Rap.) disc (right). (B and C) Same experiment as (A) performed with control isogenic strains co-expressing the unfused GAL4(BD) and the GAL4(AD)::ScFKBP12 fusion protein (B) or the GAL4(BD)::AtFRB fusion protein and the unfused GAL4(AD) (C).

for the *FPR1* gene (coding for endogenous yeast FKBP12) and co-expressing the GAL4 DNA-binding domain [GAL4(BD)] fused to the AtTOR FRB domain (AtFRB) and the GAL4 activation domain [GAL4(AD)] fused to yeast FKBP12 (ScFKBP12) were plated on selective media. Yeast growth on this medium was dependent on the expression of the *GAL-ADE2* reporter gene. Yeast cells were then overlaid with small discs containing 1 µg rapamycin or a control solution. After 5 days, colonies were readily observable around the disc containing rapamycin but not around the control disc (Fig. 2A). The two isogenic control strains co-expressing the unfused GAL4(BD) and the GAL4(AD)::ScFKBP12 fusion, or the GAL4(BD)::AtFRB fusion and the unfused GAL4(AD), were not able to grow even around the rapamycin disc (Fig. 2B and C). This shows that AtTOR is able to bind yeast FKBP12 but only in the presence of rapamycin.

#### **Identification of two *AtTOR* knock-out mutants.**

To investigate AtTOR functions, a search for knock-out mutants in the INRA T-DNA insertion library was performed (11, 16). One allele (*tor-1*) was identified in a screen based on the expression of the GUS reporter gene in the root (18). Southern analysis shows that *tor-1* contains a single T-DNA insertion (Fig. 3A and B). In this allele the GUS reporter gene of the T-DNA is translationally fused to the *TOR* gene leading to the creation of the translational fusion of the GUS protein and amino acid 1555 of AtTOR (Fig. 3C). A second *TOR* mutant (*tor-2*) was found in a PCR screen of the same collection. After three backcross to discard unlinked T-DNA insertions, a complex pattern of inserted T-DNA was found to be genetically linked to the *AtTOR* locus (data not shown). In both alleles, the T-DNA is inserted upstream of the FRB domain of AtTOR.

In the progeny of *TOR/tor-1* and *TOR/tor-2* plants, a 2/1 ratio of segregation for kanamycin resistance (a marker carried by the T-DNA) was observed (respectively 420/226;  $\chi^2(2/1) = 0,72$ ;  $p > 0,1$  and 544/304;  $\chi^2(2/1) =$ ;  $p > 0,05$ ). This suggests a default of transmission of the *tor* alleles to the next generation (see below). Further analysis showed that, in both lines, one quarter of the seeds from a heterozygous silique had aborted (aborted/normal seeds ratios of 186/594 into *TOR/tor-1* siliques and 82/271 into *TOR/tor-2* siliques lead to respective  $\chi^2(1/3)$  of 0,49 and 0,58 with  $p > 0,1$ ). The embryo-lethal seeds are randomly distributed along the silique (Fig. 4A). The absence of segregation distortion shows that *tor*- alleles are equally well



**Article 1, figure 3.** The T-DNA insertion in the *tor-1* mutant. (A and B) Southern blot analysis of genomic DNA from the heterozygous *TOR/tor-1* line compared to wild type (wt). 5 mg of DNA were digested with *EcoRI*, electrophoresed, transferred to a nylon membrane and hybridized with a AtTOR-FRB (A) or a GUS (B) probe. (C) Representation of the T-DNA insertion site in *tor-1*. *uidA*, is the sequence coding for the b-glucuronidase (GUS); *nptII*, and *bar* are the coding sequences of the kanamycin and basta resistance genes respectively

transmitted by male and female gametes. Heterozygous plants do not display any detectable phenotype.

To test if these two mutant alleles belong to the same complementation group, emasculated *TOR/tor2* flowers were pollinized with pollen from *TOR/tor1* plants and *GUS* expression from the *tor1* allele (which is expressed in embryos, see below) was used as a marker of cross-pollinisation. *GUS* stained aborted embryos were found in the siliques resulting from these crosses demonstrating that the two mutant alleles are not able to complement each other. It was therefore concluded that the embryo lethal phenotype in these two lines was due to the knock-out of *AtTOR*.

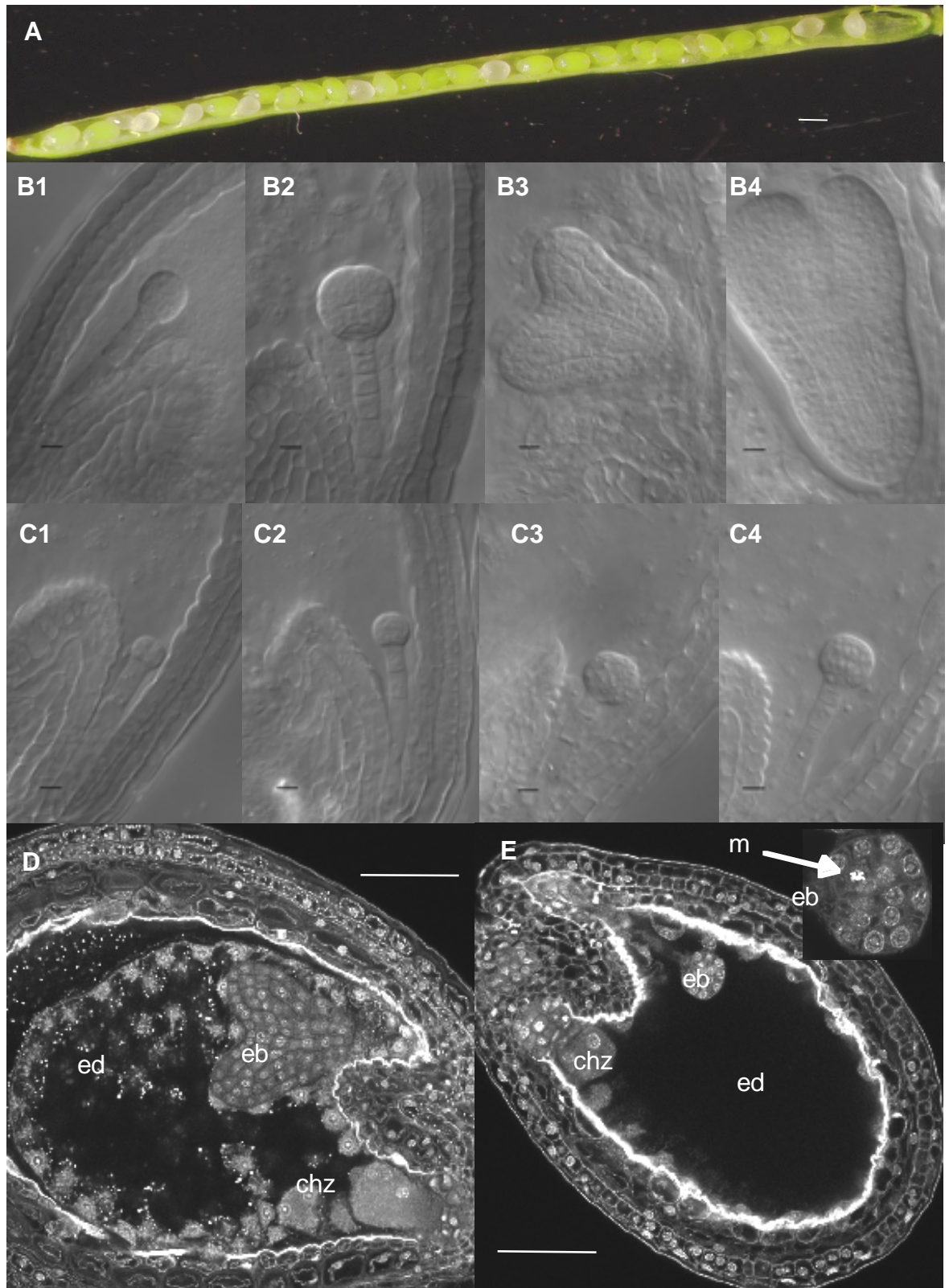
### **Disruption of *AtTOR* leads to the premature arrest of endosperm and embryo development.**

Closer observation of the immature aborted seeds revealed that both *tor-1/tor-1* and *tor-2/tor-2* embryos are all arrested at the dermatogen stage (Fig. 4B-E), still containing cells in metaphase (Fig. 4E). This shows that division itself is not inhibited as a consequence of *AtTOR* disruption.

In higher plants, the products of the double fertilisation process are the embryo and the endosperm, a triploid tissue providing nutrients for embryo development and seed germination (19). During embryogenesis the endosperm initially grows as a syncytium until it reaches around 200 nuclei and then the cellularization occurs. In the *tor* mutant endosperm, the number of nuclei was only 48 +/- 13 and cellularization does not occur (compare Fig. 4E with Fig. 4D). For comparison, in a wild type seed an endosperm with 44-48 nuclei corresponds to an embryo at the 2-4 cells stage (20). This shows that endosperm is arrested at an earlier developmental stage than the embryo in *tor* seeds.

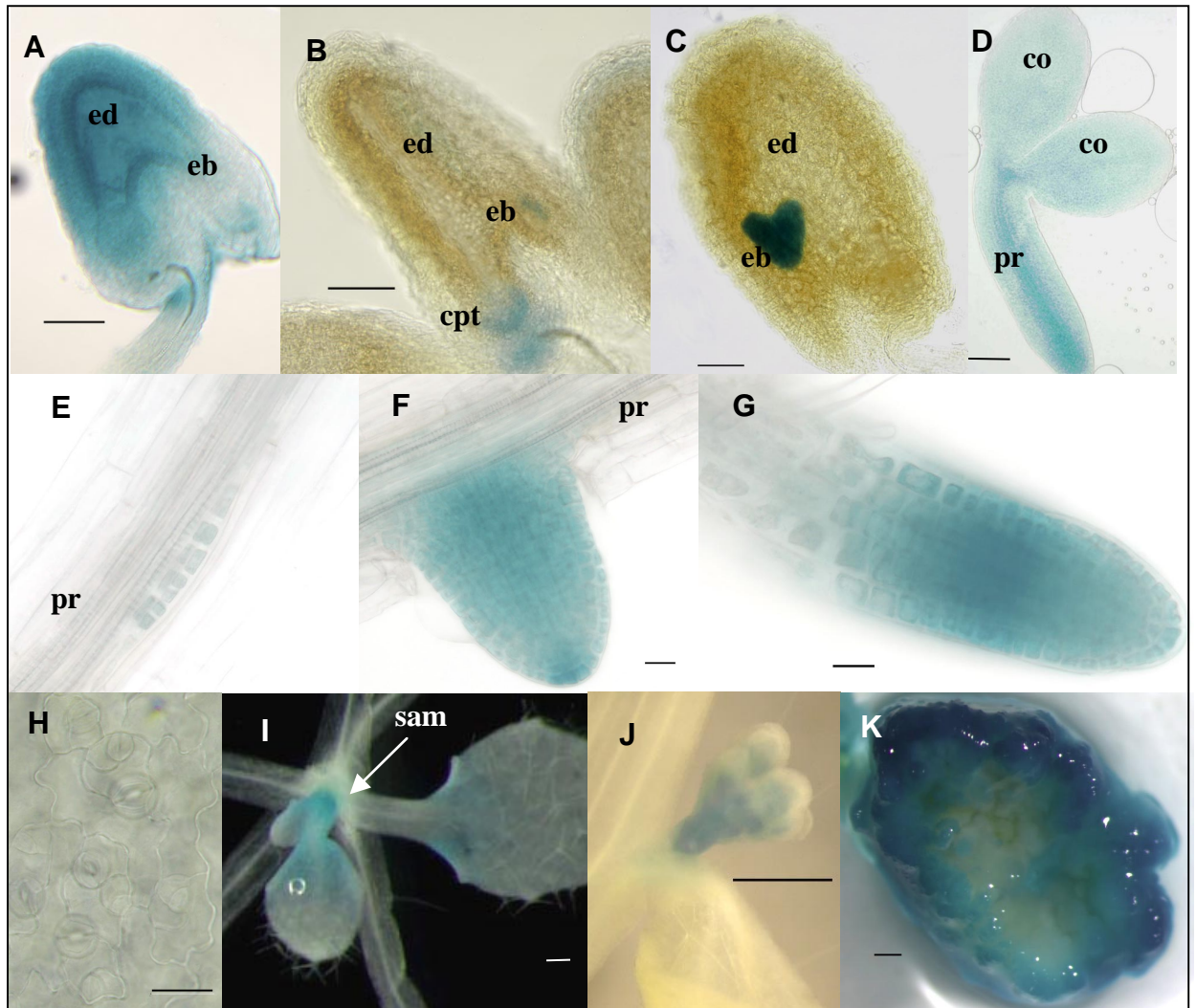
### ***AtTOR* is expressed in embryos, endosperm and primary meristems.**

*TOR/tor-1* plants were used to monitor the pattern of *AtTOR* expression through different developmental stages. In these plants *GUS* expression is driven by the *AtTOR* regulatory elements in their native genomic environment. One day after fertilization, *GUS* staining was detected in the endosperm, the embryo and in the chalazal proliferating tissue (a maternal tissue) (Fig. 5A). After the early globular stage, *GUS* staining is no longer detected in the endosperm but persists in the embryo (excluding the suspensor) up to the heart and torpedo stages (Fig. 5B



**Article 1, figure 4.** Phenotype of the *tor-1* mutant. (A) Heterozygous siliques of the *tor-1* mutant prior to dessication. Normal seeds are green whereas aborted seeds are white. (B and C) Embryos from *tor-1* heterozygous siliques observed with Nomarski optics: (B) normal embryo at the dermatogen (1 and 2), heart (3) and torpedo (4) stage; (C1) to (C4) aborted mutant embryo from the same siliques as (B1) to (B4) respectively. (D and E) Normal (D) and aborted (E, with an enlargement of the embryo at the top right) seeds from the same *tor-1* silique observed by confocal microscopy after Feulgen staining. Scale bar represent 200 mm for (A), 10 mm for (B) and (C), and 50 mm for (D) and (E). ed, endosperm; eb, embryo; chz, chalazal endosperm; m, metaphase.





**Article 1, figure 5.** *AtTOR* is expressed in endosperm, embryo and primary meristems. Localisation of the *AtTOR*::GUS fusion protein in the *tor-1* mutant. Gus stainings were performed on the heterozygous mutant. (A-C) Seeds containing a quadrant (A) to heart (C) stage embryo. (D) Mature embryo. (E-G) Lateral root development at the first layers (E), emergence (F), and elongation (G) stages. (H) zoom of a leaf showing different stages of stomatal development. (I) Leaves primordium. (J) Floral buds. (K) One month-old callus transversally cut before coloration. Scale bar represent 50  $\mu$ m for (A) to (D), 20  $\mu$ m for (E) to (H) and 500  $\mu$ m for (I) to (K). ed, endosperm; eb, embryo; cpt, chalazal proliferating tissue; pr, primary root; sam, shoot apical meristem.

and C). This correlates with a proliferation of nuclei in the endosperm that precedes active proliferation of embryonic cells. In the mature embryo, the apical and the primary root meristems were stained as well as the dividing vascular tissues (Fig. 5D). In both seedling and adult plant, *AtTOR* is highly expressed in root meristems (Fig. 5E-G), in the shoot apical meristem (Fig. 5I) and in floral buds (Fig. 5J). During lateral root formation the expression is detected as soon as the first periclinal divisions of the lateral root primordia (Fig. 4E) and remains active in all cells during the formation of the emerging secondary root meristem (Fig. 4F). GUS staining was not detected in the pollen, the stem and in non-meristematic cells of hypocotyl, roots and leaves, including dividing stomatal precursors (Fig. 4H and data not shown). To further analyse the link between *AtTOR* expression and cell proliferation, callus formation was induced on explants of the heterozygous *TOR/tor-1* line by hormonal treatment. Only the proliferating cells, at the surface of the callus, were found to express GUS activity (Fig. 4K). However, GUS staining was not found in dividing stomatal precursor cells of mature leaves and in secondary meristems, showing that *AtTOR* expression is not strictly correlated with cell division. In summary, *AtTOR* expression is detected in developing endosperm and embryo, and in all the primary meristems of the plant. Studies of the *Arabidopsis* leaf using a *Cdc2::GUS* reporter gene show that patterns of cell division are randomly distributed in a defined region at the base of the developing leaf (21). This region, which also contains many non-dividing cells is almost superimposable on that of *AtTOR* expression (Fig. 4I).

## DISCUSSION

### Features of AtTOR

Our results show that *Arabidopsis TOR* gene has features in common with others *TOR* genes. Domains known to be important for TOR function are conserved in the AtTOR protein, including the C-terminal region containing the kinase domain, the FRB domain and the short C-terminal sequence. *AtTOR* appears to be a single gene in the *Arabidopsis* genome, a situation similar to that of animal genomes and in contrast with yeast in which *TOR* duplication had occurred (5, 6, 10). It remains to be determined whether the single animal and plant *TOR* genes can fulfill all the functions of yeasts *TOR1* and *TOR2*. Sequence comparisons show that the TOR2 protein of *S. cerevisiae* is the most similar to plant and animal TOR proteins suggesting that *TOR1* appeared more recently in a common ancestor of these yeasts.

The two-hybrid experiments have shown that the AtTOR FRB domain is able to form a complex with rapamycin and *S. cerevisiae* FKBP12. Formation of the FKBP12-Rapamycin-FRB complex is responsible of the anti-proliferative effect of rapamycin through inhibition of TOR proteins in a wide range of organisms and cells including *Drosophila*, mammalian cells, *S. cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* (1, 10, 13). In contrast the vegetative growth of *Arabidopsis* was found to be insensitive to this drug even at concentration up to 10  $\mu$ M, which is 100 times the concentration inhibiting yeast growth (data not shown). Interestingly, rapamycin inhibits the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*, an unicellular alga, but not of the bryophyte *Physcomitrella patens*, the monocot *Oryza sativa* and the dicots *Nicotiana tabacum* and *Brassica napus* (Fabien Nogue, personal communication and data not shown), suggesting that resistance to this drug may be a common feature of land plants. This resistance to rapamycin could be due to the impossibility of the drug to enter plant cells but it is unlikely since rapamycin is able to enter *C. reinhardtii* cells. A second explanation could be a default to form the FKBP12-Rapamycin-FRB complex. This would be more probably due to the plant FKBP12 than to the FRB since the AtTOR-FRB is able to complex with rapamycin and ScFKBP12 whereas the FKBP12 from *Vicia faba* (broad beans) does not restore the sensitivity of the *S. cerevisiae* FKBP12 mutant to rapamycin (22). In addition, we were unable to detect complex formation between AtFKBP12, AtFRB and rapamycin in the two-hybrid system (not shown). A third



hypothesis may be the incapacity of the FKBP12-Rapamycin-AtTOR complex to inhibit At TOR functions, as proposed for the resistance to rapamycin of *S. pombe* TOR proteins (6).

### **AtTOR is essential for early development**

Disruption of the *TOR* gene leads to embryonic arrest indicating a crucial role of TOR during early development in both *Drosophila* and *Arabidopsis* (10, 23, this study). Embryos homozygous for the *AtTOR* knock-out mutations cannot develop past the dermatogen stage with cells still undergoing divisions. This shows that *AtTOR* disruption is not inhibiting cell division itself. This phenotype is similar to that of growth arrested *Drosophila* larvae, as a consequence of protein synthesis defects, which can resume the cell cycle upon artificial stimulation (24). Indeed, the first cell divisions in the *Arabidopsis* embryo requires little or no increase in overall cell mass and lead to a reduction of the amount of cytoplasm relative to the nucleus (25), supporting the idea that growth arrest occurs in *tor*  $-/-$  cells as the consequence of an incapacity to synthesise cell components during the transition between the two modes of cell division. Further support to this model is given by the genetic evidence that the haploid cell divisions occur correctly during the maturation of *tor*- gametes. Cytological observations show that plant post-meiotic asymmetric cell divisions of the male gamete occur without net increase in the mass of the cytosol (26). In addition, growth of the pollen tube is polarized tip-growth involving essentially vacuole expansion and cell-wall synthesis (27). Similarly, in the female gamete, cytosolic growth occurs premeiotically and the vacuole contributes for most of the size of the embryo sac (28). A confirmation of this model would however require methods allowing a precise quantification of cytosolic mass and composition and metabolic activity in single cells.

### **Differentiated plant cells do not express AtTOR.**

*AtTOR* expression patterns are limited to the zones where cell proliferation is coupled to cytosolic growth such as primary apical and roots meristems. This is in contrast with TOR expression in mammalian cells (8, 9) and in *Drosophila* larvae (E. Hafen, personal communication) which occurs in all tissues. The growth process of mature plant cells that do not express AtTOR (expanding root, leaf and hypocotyl cells) is due to vacuole and cell wall expansion and is not related to the growth process attributed to TOR in other organisms, which involves the synthesis of cytosolic components (1). However, given the central role of TOR

proteins in relaying nutrient perception, the absence of *AtTOR* expression in differentiated cells also raise the question of the way these cells perceive nutrient starvation. One hypothesis can be that differentiated plant cells directly sense nitrogen and carbon at the level of the nitrate assimilation and carbon fixation pathways upstream of the amino-acid perception which was demonstrated to regulate TOR (1). Finally, the lack of *AtTOR* expression in stomatal precursors in which predivision growth occurs through vacuolar expansion (29) further supports the absence of an obligatory link between cell division and AtTOR activity, as discussed in the preceding section.

### **What are the components of the plant TOR pathway?**

Known targets of mTOR in animal cells are the growth regulating kinase S6K1 and the small 4E-BP1 translational regulators (1). *Arabidopsis* possess two homologs of S6K1 but they do not have the N-terminal domain of mammalian S6K1, which is required for rapamycin sensitivity, and when expressed in mammalian cells, AtS6k2 is insensitive to rapamycin (30). Concerning 4E-BPs, no homolog can be found in the *Arabidopsis* genome. However, although no structural homolog of 4E-BPs exists in *S. cerevisiae*, a functional eIF4E-associated protein (Eap1p), containing the consensus eIF4E-binding domain and able to compete with eIF4G for binding to eIF4E, has been found to be related to the TOR pathway (31). The relation with TOR of potential eIF4E-associated proteins in plants, such as the *Arabidopsis* lipoyxygenase 2 (32), remains therefore to be determined. The cyclin-dependent kinases inhibitor p27<sup>Kip1</sup> and the  $\alpha$ 4 phosphatase, two others proteins that are probably downstream of mTOR (1), also have homologs in *Arabidopsis* (33, 34). Integration of cellular TOR activity at the level of the whole organism occurs through insulin and insulin-like receptors in animals (Schmelzle and Hall 2000). However, since no equivalents of insulin and insulin-like receptors have been found in *Arabidopsis*, the question of the signals regulating AtTOR is raised. Obvious candidates are phytohormones, particularly auxins and cytokinins, which are known to affect growth and cell proliferation (35). Answers to this question would support the theory that intracellular pathways remain quite well conserved during evolution and have been recruited by different extracellular systemic signalling systems, causing major evolutionary changes (36).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Joseph Heitman (Duke University, North Carolina, USA) and Jean-Denis Faure (INRA, versailles) for the gift of yeast strain and plamids, Fabien Nogu   (INRA, Versailles) for *P. patens* experiments with rapamycin, Laurent Cournac (DEVM-CEA, Cadarache) for the gift of *C. reinhardtii* cultures, Fabienne Granier (INRA, Versailles) for help in screening T-DNA lines, Marcel Salanoubat (Genoscope, Evry, France) for help in sequencing and Ernst Hafen (Zoologisches Institut, Zürich, Switzerland) for providing unpublished results. B.M. is supported by an INRA-CEA doctoral fellowship.

## REFERENCES

1. Schmelzle, T. & Hall, M. N. (2000) *Cell* **103**, 253-262.
2. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L., & Clardy, J. (1996) *Science* **273**, 239–242.
3. Heitman, J., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1991) *Science* **253**, 905-909.
4. Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R. & Hall, M. N. (1993) *Cell* **73**, 585-596.
5. Helliwell, S., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. & Hall, M. N. (1994) *Mol. Biol. Cell* **5**, 105-118.
6. Weisman, R. & Choder, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7027-7032.
7. Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994) *Cell* **78**, 35-43.
8. Brown, E. L., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K, Keith, C.T., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1994) *Nature* **369**, 756-758.
9. Chiu, M. I., Katz, H. & Berlin, V. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12574-12578.
10. Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C. & Neufeld, T. P. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2712-2724.
11. Bouchez, D., Camilleri, C. & Caboche, M. (1993) *C. R. Acad. Sci. Paris* **316**, 1188-1193.
12. Arndt, C., Cruz, M. C., Cardenas, M. E. & Heitman, J. (1999) *Microbiology* **145**, 1989-2000.

13. Cruz, M. C., Cavallo, L. M., Gorlach, J. M., Cox, G., Perfect, J. R., Cardenas, M. E. & Heitman, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4101-4112.
14. Kohalmi, S. E., Nowak, J., & Crosby, W. L. (1997) in *Differentially expressed genes in plants: a bench manual*, eds. Hansen, E. & Harper, G. (Taylor & Francis, London), pp. 63-82.
15. Cardenas, M. E., Hemenway, C., Muir, R. S., Ye, R., Fiorentino, D. & Heitman, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 5944-5957.
16. Bechtold, N., Ellis, J. & Pelletier, G. (1993) *C. R. Acad. Sci. Paris* **316**, 1194-1199.
17. Braselton, J. P., Wilkinson, M. J. & Clulow, S. A. (1996) *Biotech. Histochem.* **71**, 84-87.
18. Sarrobert, C., Thibaud, M.-C, Contard-David, P., Gineste, S., Bechtold, N., Robaglia, C., & Nussaume, L. (2000) *Plant J.* **24**, 357-368.
19. Berger, F. (1999) *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 28-32.
20. Boissard-Lorig, C., Colon-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E., Dumas, C., Haseloff, J. & Berger, F. (2001) *Plant Cell* **13**, 495-509.
21. Donnelly, P. M, Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E. & Dengler, N. G. (1999) *Dev. Biol.* **215**, 407-419.
22. Xu, Q., Liang, S., Kudla, J. & Luan, S. (1998) *Plant J.* **15**, 511-519.
23. Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G. & Hafen, E. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2689-2694.
24. Galloni, M. & Edgar, B. A. (1999) *Development* **126**, 2365-2375.
25. Mansfield, S. G. & Briarty, L. G. (1991) *Can. J. Bot.* **69**, 461-476.
26. Owen, H. A. & Makaroff, C. A. (1995) *Protoplasma* **185**, 7-21.
27. Hepler, P. K., Vidali, L. & Cheung, A. Y. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**, 159-187.
28. Mansfield, S. G., Briarty, L. G. & Erni, S. (1991) *Can. J. Bot.* **69**, 447-460.
29. Zhao, L. & Sack, F. D. (1999) *Am. J. Bot.* **86**, 929-939.
30. Turck, F., Kozma, S. C., Thomas, G. & Nagy, F. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2038-2044.
31. Cosentino, G. P., Schmelzle, T., Haghighat, A., Helliwell, S. B., Hall, M. N. & Sonenberg, N. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4604-4613.
32. Freire, M. A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K. S. & Robaglia, C. (2000) *Plant Mol. Biol.* **44**, 129-140.
33. De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. & Inze, D. (2001) *Plant Cell* **13**, 1653-1668.

34. Harris, D. M., Myrick T. L. & Rundle S. J. (1999) *Plant Physiol.* **121**, 609-617.
35. Stals, H. & Inzé, D. (2001) *Trends Plant Sci.* **6**, 359-364.
36. Duboule, D. & Wilkins, A. S. (1998) *Trends Genet.* **14**, 54-59.

### 1.3 Données complémentaires à l'article 1

Les sous-chapitres 1.3.1. et 1.3.2. présentent des résultats qui ont été cités comme « data not shown » dans l'article 1. Les deux sous-chapitres suivant décrivent des résultats concernant le profil d'expression de *AtTOR*.

#### 1.3.1 Phénotype du mutant *tor-2*

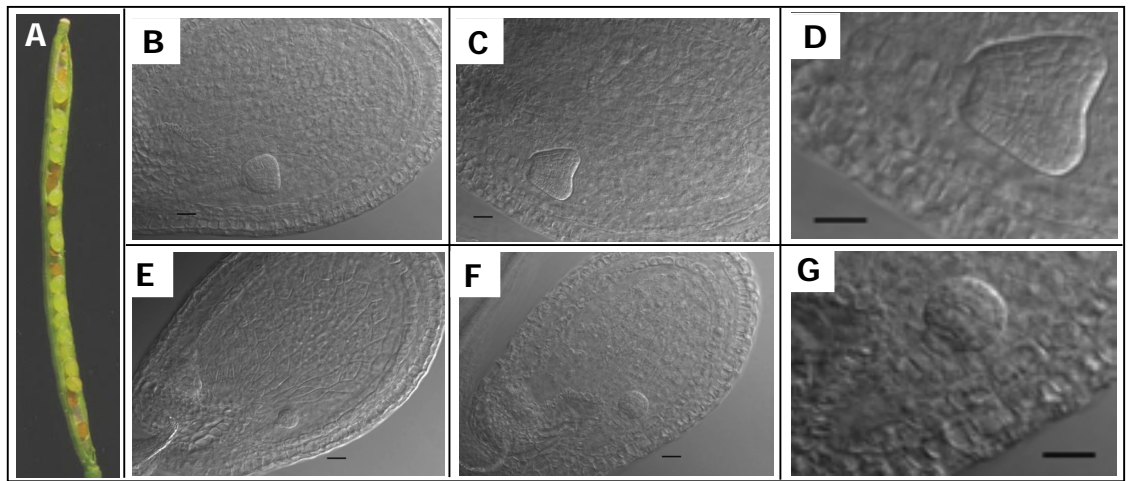
La figure 34 présente le phénotype du mutant *tor-2*. Une silique hétérozygote pour la mutation *tor-2* produit un quart de graines avortées (Fig. 34A ; article 1). Des observations en microscopie Nomarsky montrent que le développement de l'embryon est arrêté au stade globulaire comme pour le mutant *tor-1* (comparez les Fig. 34 E-G avec les Fig. 4B-C de l'article 1).

#### 1.3.2 Absence de phénotype chez les mutants *tor-1* et *tor-2* hétérozygotes

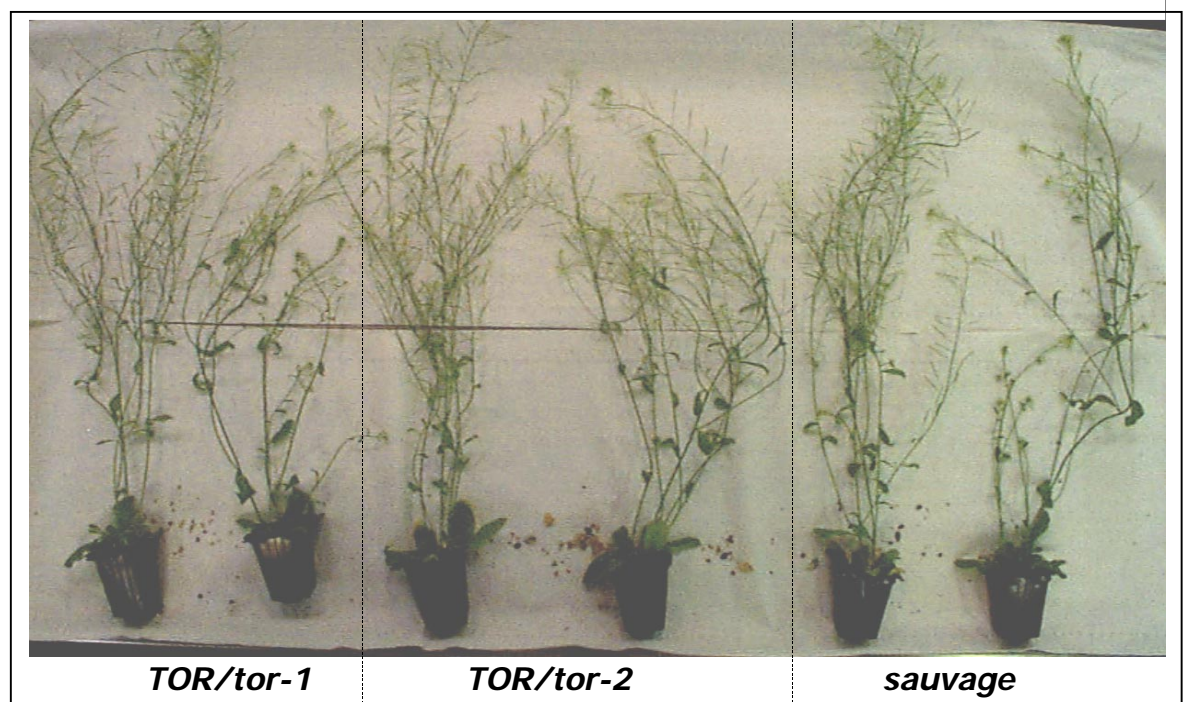
Des plantes adultes hétérozygotes pour les mutations *tor-1* et *tor-2* ont été photographiées à côté de plantes sauvages du même âge, cultivées dans les mêmes conditions (Fig. 35). On peut observer que les deux mutants hétérozygotes ont une taille et une morphologie similaire aux plantes sauvages. De plus, aucun retard de floraison n'est observé. Seule l'observation des siliques disséquées permet de distinguer les plantes hétérozygotes pour les mutations *tor1* et *tor-2* des sauvages. Cela montre que ces mutations sont récessives.

#### 1.3.3 Profil d'expression de *AtTOR* après traitements par des phytohormones

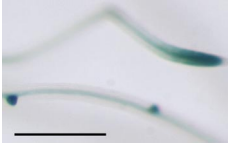
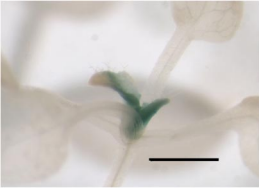
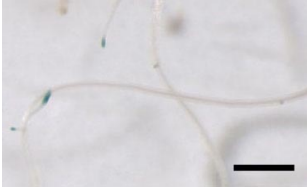
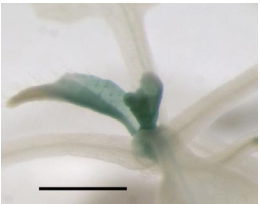
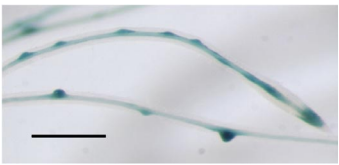
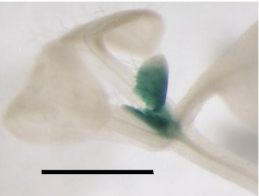
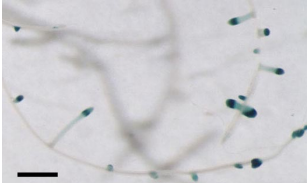

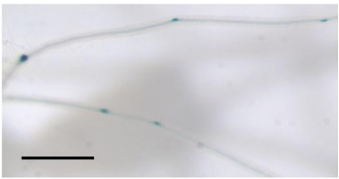
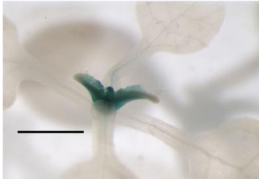
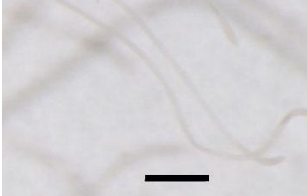
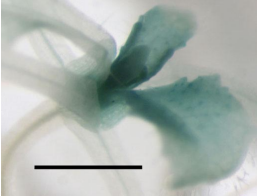
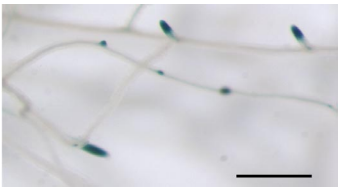
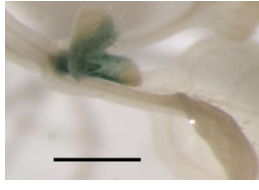
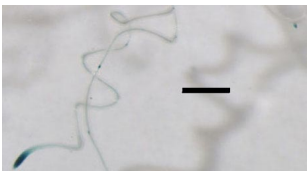
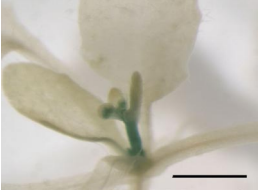
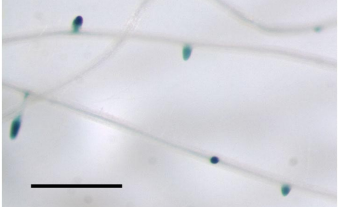
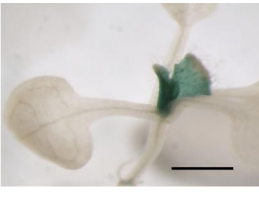
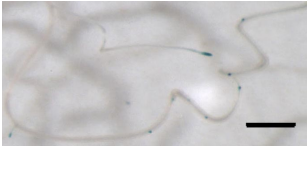

Les plantes hétérozygotes *TOR/tor-1* qui contiennent la fusion *AtTOR::GUS* ont été utilisées pour analyser le profil d'expression de *AtTOR* en réponse à des phytohormones (Fig. 36). Les hormones ayant le plus d'effet sur l'expression de *AtTOR* sont le 2,4D (une auxine) et la zéatine (une cytokinine). L'auxine induit l'expression de *AtTOR* dans les tissus vasculaires des racines au bout de 24 h de traitement. Après 72 h, l'expression de *AtTOR* devient restreinte aux méristèmes des nombreuses racines latérales induites par l'auxine. Par contre, la cytokinine induit l'expression de *AtTOR* au niveau du méristème apical caulinaire mais inhibe son expression au niveau des racines (phénomènes visibles après 72 h). Ces effets de ces deux hormones sur l'expression de *AtTOR* sont similaires à ceux décrits avec des gènes du cycle cellulaire et reflètent la compétence pour la prolifération au niveau des méristèmes (Hemerly *et al.*, 1993 ; Ferreira *et al.*, 1994 ; Doerner *et al.*, 1996 ). Ainsi, les hormones testées n'induisent pas l'expression de *AtTOR* dans des tissus où il n'est pas exprimé sans traitement, comme les



**Figure 34 : phénotype du mutant *tor-2*.** A, silique disséquée d'un mutant *tor-2* hétérozygote. B à G, graines d'une même silique de l'hétérozygote observées en microscopie Nomarski. B à D, graines normales. E à G, graines avortées. D et G sont des grossissements de C et F respectivement. Barre, 20  $\mu$ m.



**Figure 35 : absence de phénotype apparent chez les plantes hétérozygotes pour les mutations *tor-1* et *tor-2*.** Deux plantes de chaque lignée, âgées de 44 jours, cultivées dans les mêmes conditions, ont été placées côtes à côtes pour comparaison. Etant donné que les plantes mutantes proviennent de semis de graines issues de l'hétérozygotes, non sélectionnées sur kanamycine, l'hétérozygotie a été vérifiée par observation de graines avortée dans les siliques.

	durée du traitement (t)			
	24 h		120 h	
<b>contrôle (éthanol DMSO)</b>				
<b>2,4D <math>10^{-7}</math> M (auxine)</b>				
<b>Zeatine <math>10^{-6}</math> M (cyto- kinine)</b>				
<b>ABA <math>10^{-7}</math> M (acide absi- sique)</b>				
<b>GA3 <math>10^{-5}</math> M (gibbér- elline)</b>				

**Figure 36 : profil d'expression de *AtTOR* après traitements avec des phytohormones.** Les plantes heterozygotes *TOR/tor-1* contenant la fusion *AtTOR::GUS* ont été utilisées. Des plantules ayant poussé pendant 10 jours sur un milieu H/2 à 0,7 % d'agar ont été transférée (t = 0h) sur milieux H/2 à 0,5 % d'agar (de sorte que les racines pénètrent bien le milieu) contenant l'hormone indiquée diluée dans un mélange d'éthanol (10%) et de diméthyl sulfoxide (DMSO, 10%). Les plantes ont ensuite été prélevée au temps indiqué puis traitées au colorant GUS. Barre, 1 mm.

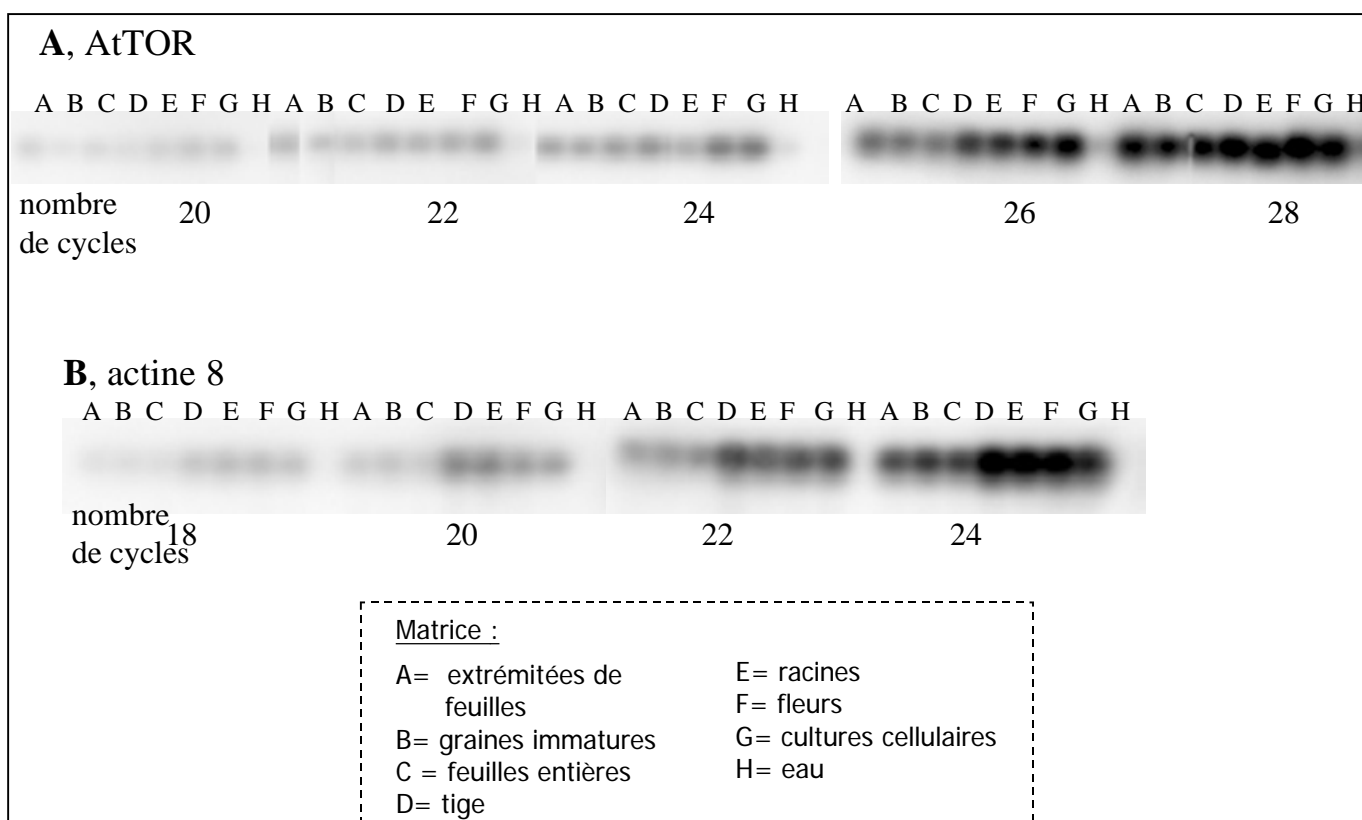


feuilles adultes par exemple, mais induisent simplement une expression de *AtTOR* dans les méristèmes qu'elles activent. Cependant, cela n'exclut pas un contrôle post-traductionnel de l'activité de AtTOR par les hormones.

#### 1.3.4 Suivi de l'ARNm de *AtTOR*

La fusion traductionnelle entre *AtTOR* et *GUS* présente dans le mutant *tor-1* a permis d'analyser le profil d'expression de *AtTOR* résultant à la fois des régulations transcriptionnelles et traductionnelles. Afin d'étudier les éventuelles régulations transcriptionnelles de l'expression de *AtTOR*, les ARNm de *AtTOR* ont été analysés avec la méthode de northern. Plusieurs essais ont été réalisés, dans un premier temps avec des ARN totaux extraits à partir de différents tissus et de cultures cellulaires d'*Arabidopsis*, puis par la suite, à partir d'ARN polyA+ purifiés. Aucune bande n'a pu être détectée, même avec une ribosonde (sonde ARN) sur des ARN polyA+ purifiés à partir d'une culture cellulaire (résultat non présenté). Pourtant, la culture cellulaire a été choisie car c'est le type de cellules dans lequel nous avons le plus de chances de détecter l'ARNm de *AtTOR*, puisqu'il s'agit de micro-cals en suspension et que les cals hétérozygotes *TOR/tor-1* présentent une forte coloration GUS (Axelos *et al.*, 1992 ; article 1, Fig. 5). Cette impossibilité de détecter l'ARNm de *AtTOR* par la méthode de northern indique que la quantité de transcrits de ce gène est faible. De même, l'ARNm de *AtATM*, un autre membre de la famille des PI3-K est très difficile à détecter par la méthode de Northern (Garcia *et al.*, 2000).

Etant donné que nous n'avons pas réussi à détecter l'ARNm de *AtTOR* par transfert de northern, nous avons utilisé la méthode de RT-PCR semi-quantitative qui est plus sensible (Fig. 37). Le gène *ACT8* codant l'Actine-8 a été utilisé comme contrôle car il est exprimé constitutivement chez *Arabidopsis* (An *et al.*, 1996). Cette RT-PCR montre que le transcrit de *AtTOR* est exprimé dans tous les tissus d'*Arabidopsis*, même ceux où le GUS n'est pas détectable (Fig. 37A ; article 1, Fig. 5). Cependant, *AtTOR* est exprimé à un niveau nettement plus faible que *ACT8* puisque 4 cycles de PCR supplémentaires (ce qui équivaut à un facteur 16) avec les amorces TORsq sont nécessaires pour obtenir des bandes de la même intensité qu'avec les amorces ACT8 (comparez les Fig.37 A et B).



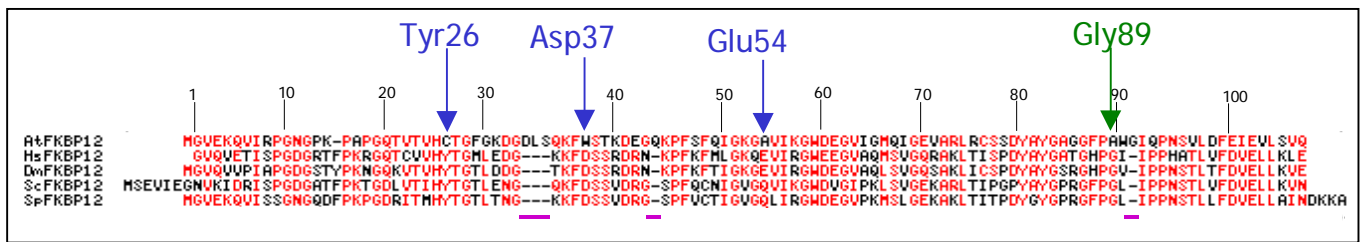
**Figure 37 : analyse de l'expression de *AtTOR* par RT-PCR semi-quantitative.** La transcription inverse (RT) a été réalisée avec une amorce oligoT à partir de 1µg d'ARN totaux. Les PCR ont ensuite été réalisées avec les amorces spécifique TORsq5' et TORsq3' (**A**) ou ACT8sq5' et ACT8sq3' (**B**) à partir de produits de RT dilués 10 fois, en faisant le nombre de cycles indiqué. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % puis transférés sur une membrane de nylon est hybridés avec la sonde TORsq (**A**) ou la sonde ou la sonde ACT8 (**B**).

## 4 Etude des interactions potentielles entre AtTOR, la rapamycine et les FKBP d'*Arabidopsis*

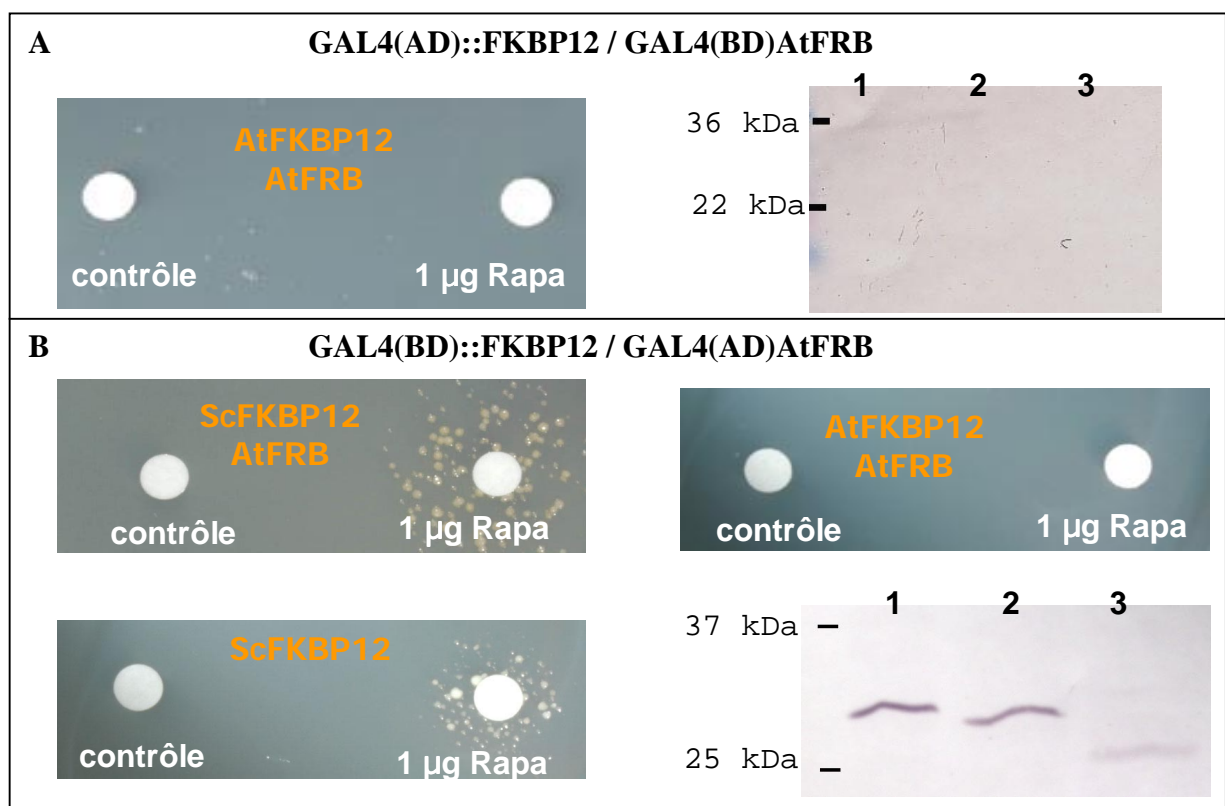
Comme nous l'avons vu en introduction, la rapamycine a joué un rôle essentiel dans l'étude de la voie de TOR. Cependant, nous avons montré qu'*Arabidopsis* est résistante la rapamycine. Ainsi, élucider la raison de cette résistance à la rapamycine pourrait peut-être nous permettre de développer une stratégie pour créer une plante sensible à la rapamycine afin d'étudier la voie de AtTOR par une approche pharmacologique.

### 4.1 AtTOR ne se fixe pas à AtFKBP12 en présence de rapamycine

L'expérience de double hybride décrite dans l'article 1 (Article1, Fig. 2) montre que le domaine FRB de AtTOR est capable d'interagir avec ScFKPB12 en présence de rapamycine. Cela suggère que la résistance d'*Arabidopsis* à la rapamycine n'est pas due à l'incapacité de AtTOR de fixer la rapamycine. Par contre, il est possible que le complexe ne se forme pas chez *Arabidopsis* à cause de modifications au sein de du FKBP12. En effet, un alignement de la séquence d'AtFKBP12 avec celles des FKBP12 d'animaux et de levures montre que AtFKBP12 ne contient pas certains résidus importants pour l'interaction avec la rapamycine (Fig. 38). Ainsi, les résidus tyrosine 26, asparagine 37 et Glutamate 44 de HsFKBP12, qui sont conservés chez les levures et les animaux, sont remplacés par d'autres résidus chez AtFKBP12. De plus, quelques résidus supplémentaires sont observés dans la séquence de AtFKBP12. D'autre part, le FKBP12 de *Vicia faba* n'est pas capable de restaurer la résistance à la rapamycine chez une souche de *S. cerevisiae* délétée du gène codant ScFKBP12 (Xu *et al.*, 1998). Nous avons donc essayé une expérience de double hybride similaire à celle qui est décrite dans l'article 1 en utilisant AtFKBP12 à la place de ScFKBP12 (Fig. 39A). Le complexe FKBP12-rapamycine-FRB ne se forme pas dans ces conditions, ce qui suggère que AtFRB n'est pas capable d'interagir avec AtFKBP12 et la rapamycine. Cependant, il n'a pas été possible de détecter la protéine de fusion GAL4(AD)::AtFKBP12 dans des extraits des levures utilisées par transfert de Western avec un anticorps dirigé contre GAL4(AD) (Fig. 39A). Cela s'explique par la mauvaise qualité de l'anticorps utilisé, puisque la protéine de fusion GAL4(AD)::ScFKBP12 n'est pas détectable à partir d'extraits de levures transformées avec GAL4(AD)::ScFKBP12 et GAL4(BD)::AtFRB, alors que le complexe ternaire se forme dans ces levures (Fig. 39A et article 1). Toutefois, il n'a pas pu être confirmé que AtFKB12 est bien exprimé. Afin de résoudre ce problème, une expérience analogue a été réalisée en inversant les domaines GAL4. Dans ce cas, comme attendu, les levures co-exprimant GAL4(BD)::ScFKBP12 et GAL4(AD)::AtFRB grandissent



**Figure 38 :** Alignement de AtFKBP12 avec les FKBP12 de *H. sapiens* (Hs), de drosophile (Dm), de *S. cerevisiae* (Sc) et de *S. pombe* (Sp). Les résidus conservés sont en rouge. Les flèches indiquent les résidus important pour la formation du complexe ternaire FRB-rapamycine-FKBP12 (Choi *et al.*, 1996 ; Liang *et al.*, 1999). Les flèches vertes correspondent à des résidus d'interaction avec la rapamycine et la flèche bleue à un résidu d'interaction avec le FRB. La numérotation correspond aux résidus de HsFKBP12. Les traits violets soulignent les résidus supplémentaires dans AtFKBP12 qui sont susceptibles de modifier la structure de la protéine.

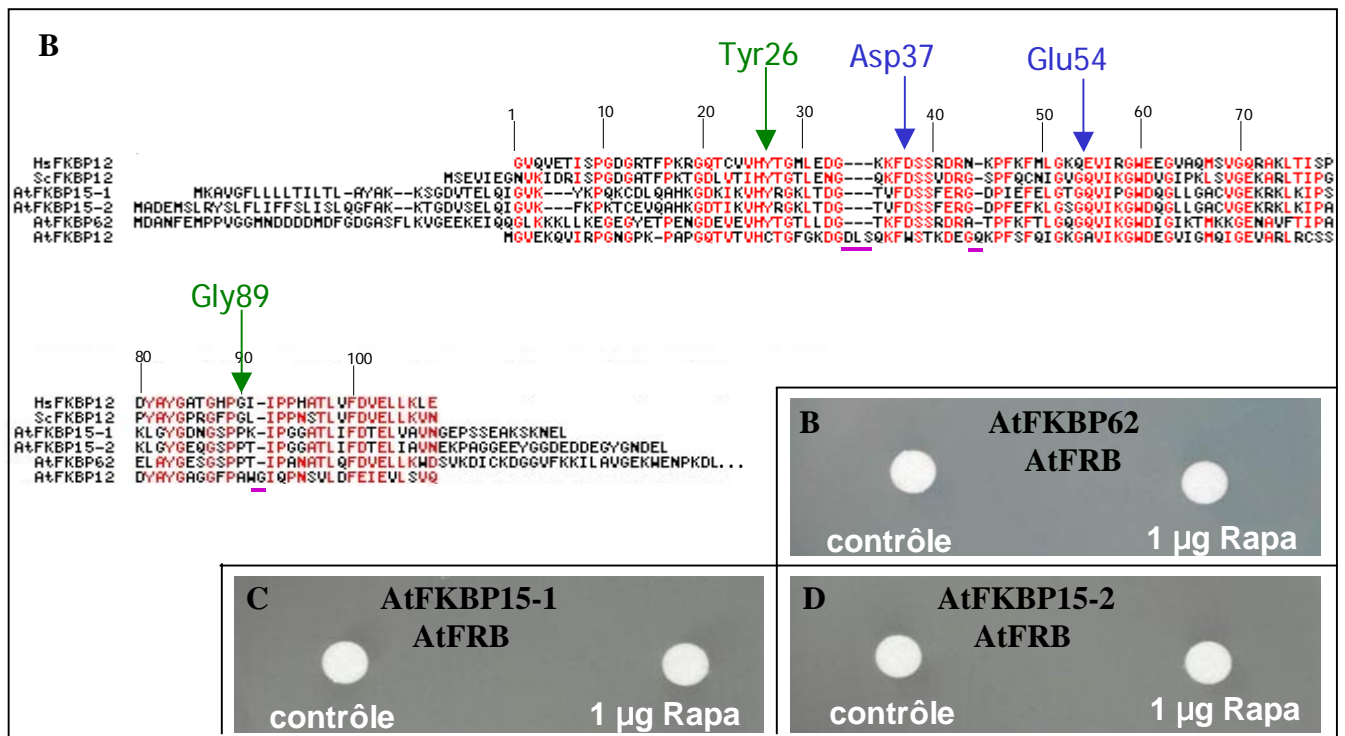


**Figure 39 : expériences de double-hybride montrant l'absence d'interaction entre AtFKBP12 et AtFRB en présence de rapamycine.** Les constructions contenant les protéines de fusion ont été co-exprimées avec une version résistante à la rapamycine de TOR1 dans la souche SMY87-4 qui a ensuite été étalée sur un milieu dépourvu d'adénine. Les levures ont poussé 5 jours à 30°C. La formation du complexe FKBP12-rapamycin-FRB induit l'expression du gène rapporteur *GAL-ADE2* qui permet la croissance en absence d'adénine autour du papier whatman imbibé de rapamycine. **A**, expérience analogue à celle décrite dans l'article 1 (Fig. 2). Ici, AtFKBP12 au lieu de ScFKBP12 est fusionné au GAL4(AD) (à gauche). A droite, analyse, par la méthode de Western avec un anticorps dirigé contre GAL4(AD), de protéines extraites à partir d'une unité OD<sub>600 nm</sub> de levures exprimant : ligne 1, GAL4(AD)::ScFKBP12 et GAL4(BD)::AtFRB ; ligne 2, GAL4(AD)::AtFKBP12 et GAL4(BD)::AtFRB ; ligne 3, GAL4(AD) non fusionné et GAL4(BD)::AtFRB. **B**, expérience similaire en inversant les domaines GAL4 : le FKBP12 indiqué, fusionné au GAL4(BD), est co-exprimé avec AtFRB fusionné au GAL4(AD). En bas à droite, contrôle exprimant la fusion GAL4(BD)::ScFKBP12 avec GAL4(AD) non fusionné. En bas à droite, analyse, par la méthode de Western avec un anticorps dirigé contre GAL4(BD), de protéines extraites à partir d'une unité OD<sub>600</sub> de levures exprimant : ligne 1, GAL4(BD)::ScFKBP12 et GAL4(AD)::AtFRB ; ligne 2, GAL4(BD)::ScFKBP12 et GAL4(AD)::AtFRB ; ligne 3, souche exprimant GAL4(BD) non fusionné et GAL4(AD)::AtFRB. GAL4(AD), domaine activateur de GAL4 ; GAL4(BD),

autour de la rapamycine. Notons, que cette expérience n'aurait pas pu être utilisée pour démontrer l'interaction entre ScFKBP12 et AtFRB puisque les levures contrôles n'exprimant que GAL4(BD)::ScFKBP12 croissent autour de la rapamycine. Par contre, les levures co-exprimant GAL4(BD)::AtFKBP12 et GAL4(AD)::AtFRB ne sont pas capables de croître sur milieu sélectif pour la formation du complexe en présence de rapamycine (Fig. 39B). De plus, il a pu être démontré par un transfert de Western en utilisant un anticorps dirigé contre GAL4(BD) que, dans ce contexte, la protéine GAL4(BD)::AtFKBP12 est exprimée en quantité similaire à GAL4(BD)::ScFKBP12 (Fig. 39B). L'absence d'interaction ne vient donc pas d'un problème d'expression de la protéine de fusion GAL4(BD)::AtFKBP12 et reflète donc l'incapacité de AtFKBP12 à former un complexe avec la rapamycine et AtFRB.

## 4.2 Analyse des autres FKBP d'*Arabidopsis*

FKBP12 est la plus petite protéine d'une famille qui comprend 17 membres chez *Arabidopsis*, certaines étant impliquées dans la réponse aux cytokinines (Harrar *et al.*, 2001). Chacun de ces membres, dont la taille varie de 12 à 71 kDa, possède au moins un domaine homologue au domaine FKBP typique de ScFKBP12 et pourrait donc être potentiellement capable d'interagir avec AtTOR et la rapamycine. Nous avons utilisé le programme BLAST pour identifier, dans le génome d'*Arabidopsis*, les FKBP qui ont les domaines FKBP les plus proches de ScFKBP12. Les AtFKBP 15-1 et 15-2 et le premier domaine FKBP de AtFKBP62 d'*Arabidopsis* ont donné les meilleurs résultats lors de cette recherche (Luan *et al.*, 1996 ; Vucich et Gasser, 1996). L'alignement de leur séquence avec celles des ScFKBP12, HsFKBP12 et AtFKBP12 montre que les résidus d'interaction avec la rapamycine qui ne sont pas conservés chez AtFKBP12 le sont chez AtFKBP15-1, AtFKBP15-2 et AtFKBP62 (Fig. 40A). Aucun de ces 3 FKBP n'interagit avec AtFRB en double hybride en présence de rapamycine (Fig. 40B à D). Cela peut entre autres s'expliquer par la présence, chez ces 3 FKBP, d'une proline à la place de la glycine 89 de HsFKBP12. Cette glycine joue un rôle important dans l'interaction avec FRB et son remplacement par une proline empêche la formation du complexe selon la structure en 3 dimensions modélisée (Liang *et al.*, 1999). AtFKBP20 et le premier domaine FKBP de AtFKBP62 qui ont été décrits récemment et sont fortement similaires à HsFKBP12 possèdent aussi cette proline à la place de la glycine 89 (Harra *et al.*, 2001). Ces analyses suggèrent qu'aucun FKBP d'*Arabidopsis* n'est capable d'interagir avec la rapamycine et AtFRB, ce qui pourrait expliquer la résistance de cette plante à cette drogue.



**Figure 40 : analyse de 3 FKBP d'*Arabidopsis* pour leur capacité à fixer AtFRB.** A, alignement de HsFKBP12 et ScFKBP12 (capable d'interagir avec AtFRB) avec 4 FKBP d'*Arabidopsis*. Les résidus conservés sont en rouge. Les flèches indiquent les résidus important pour la formation du complexe ternaire FRB-rapamycine-FKBP12 (Choi *et al.*, 1996 ; Liang *et al.*, 1999). Les flèches vertes correspondent à des résidus d'interaction avec la rapamycine et la flèche bleue à un résidu d'interaction avec le FRB. La numérotation correspond aux résidus de HsFKBP12. **B** à **D**, test double-hybride d'interaction entre AtFRB et 3 FKBP d'*Arabidopsis* proches de ScFKBP12. Il s'agit d'une expérience similaire à celle décrite dans la Fig. 39B. La seule différence est le remplacement de AtFKBP12 par AtFKBP62 (**B**), AtFKBP15-1 (**C**) ou AtFKBP15-2 (**D**).

### 4.3 Transformation d'*Arabidopsis* avec le gène codant le FKBP12 de *S. cerevisiae*

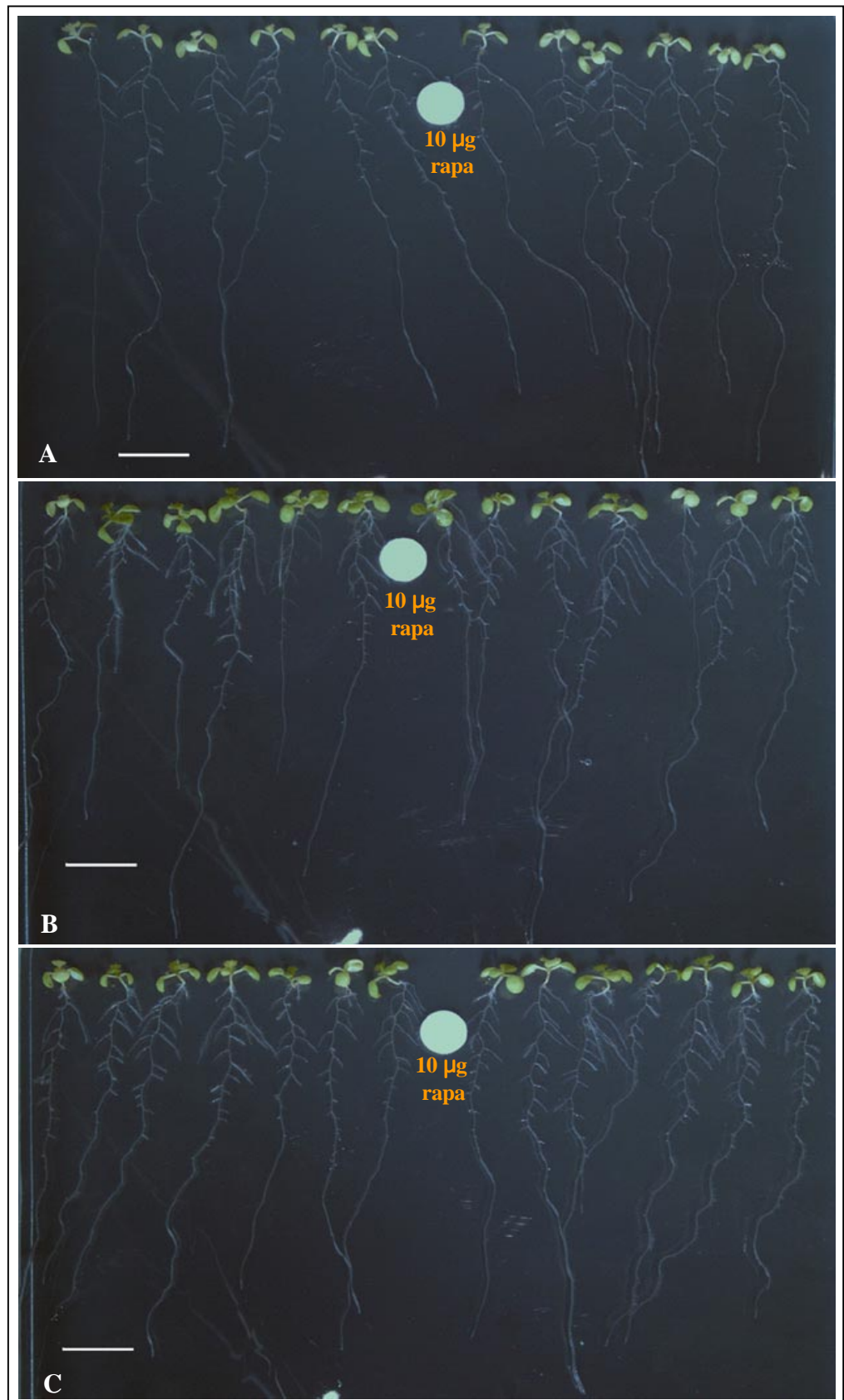
Le fait qu'aucun FKBP d'*Arabidopsis* ne semble pas capable de former un complexe avec la rapamycine et AtFRB, alors que ScFKBP12 y parvient chez la levure nous a amené à penser que l'expression de ScFKBP12 dans *Arabidopsis* pourrait suffire à rendre cette plante sensible à la rapamycine.

#### 4.3.1 Utilisation du promoteur de *AtTOR*

Dans un premier temps, le promoteur de *AtTOR* a été choisi pour exprimer ScFKBP12 dans les tissus d'*Arabidopsis* exprimant AtTOR. pour cela, la séquence codante de ScFKBP12 a été clonée en aval d'une séquence de 2480 pb, allant de la fin du cadre de lecture ouvert précédent celui de *AtTOR* à la fin de la séquence de tête de *AtTOR*. Quinze lignées transformées ont été obtenues. Une construction contrôle a également été réalisée en introduisant la séquence codant d'une protéine fluorescente (GFP4 : Green Fluorescent Protein) à la place de celle de ScFKBP12. Aucune des 15 lignées transformée avec cette construction ne présente un niveau de fluorescence supérieure à celui du sauvage. Ainsi, la séquence promotrice choisie pour ces constructions ne permet pas l'expression de ce gène rapporteur. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'un ou plusieurs introns soient nécessaires pour l'expression de *AtTOR*. En effet, plusieurs cas où le premier intron est nécessaire pour l'expression d'un gène ont été décrits chez *Arabidopsis* (Gidekel *et al.*, 1996 ; Rose et Last, 1997 ; Fridborg *et al.*, 2001). Nous avons donc choisi un promoteur mieux caractérisé pour exprimer ScFKBP12 dans *Arabidopsis*.

#### 4.3.2 Utilisation du promoteur 35S

Afin d'assurer l'expression de ScFKBP12 dans *Arabidopsis*, nous avons placé sa séquence codante sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur dans le vecteur binaire pGPTV. Trente six plantes transformées (détectées par leur résistance à l'hygromycine apportée par l'ADN-T) ont été obtenues avec cette construction. Un test de sensibilité à la rapamycine a été réalisé sur 10 de ces lignées transformées et aucune ne s'est avérée sensible (Fig. 41). Cependant, il reste à vérifier par transfert de Northern que ces lignées expriment bien ScFKBP12 avant de conclure que l'expression de ScFKBP12 ne suffit pas à sensibiliser *Arabidopsis* à la rapamycine.



**Figure 41 : Effet de la rapamycine sur des plantes portant la construction 35S-ScFKBP12.** La rapamycine (10  $\mu$ g) a été déposée sur le disque de papier whatman avant germination. les plantes sont homozygotes et ont été photographiées 13 jours après germination. **A**, lignée 1. **B**, lignée 33. **C**, lignée 34. Barre, 1 cm.



## 5 Initiation d'un projet de sur-expression de *AtTOR*

### 5.1 Expression de *AtTOR* sous le contrôle du promoteur 35S

Une construction dans laquelle la séquence codante de *AtTOR* est placée sous le contrôle du promoteur 35S dans le vecteur binaire pGPTV a été réalisée afin de sur-exprimer AtTOR dans les plantes. Cependant, malgré trois tentatives de transformation, il n'a pas été possible d'introduire cette construction dans *A. tumefaciens*. Il est possible que ce problème résulte de la toxicité de AtTOR dans *Agrobacterium*. En effet, le promoteur 35S est actif dans cette bactérie (Vancanneyt *et al.*, 1990). Aucune plante n'a donc pu être transformée avec cette construction. Un tel problème pourrait être résolu par l'introduction d'un intron dans l'ADNc afin d'empêcher son expression dans *Agrobacterium*.

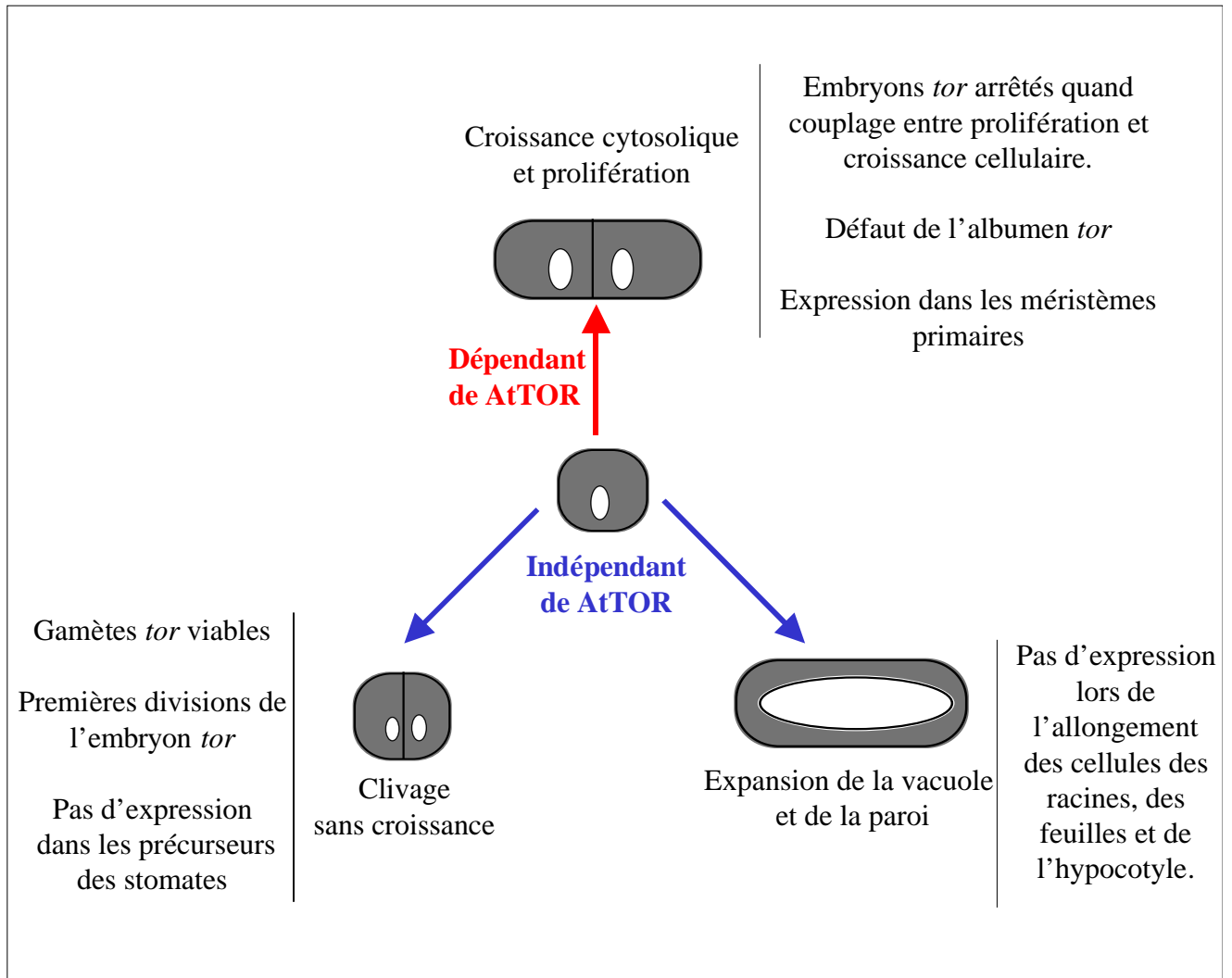
### 5.2 Le système UAS-GAL4 pour induire la sur-expression de *AtTOR*

Afin de palier au problème lié à l'expression du promoteur 35S dans *Agrobacterium*, nous avons décidé d'utiliser le système de trans-activation GAL4 /UAS (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). La protéine GAL4, placée sous le contrôle d'un promoteur déterminé, active l'expression du gène d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur UAS est sous le contrôle de promoteurs spécifiques au gynécée. Des plantes ont donc été transformées avec une construction contenant l'ADNc de *AtTOR* placé sous le contrôle du promoteur UAS. Une vingtaine de transformants ont été obtenus, et certaines lignées ont été croisées avec des plantes contenant une construction 35S-GAL4 (fournie par Stéphanie Broyer, Ecole Nationale Supérieure de Lyon). Si le système fonctionne, la construction *UAS-AtTOR* pourra être croisée avec des lignées exprimant GAL4 sous le contrôle de promoteurs plus spécifiques de certains tissus.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons montré que *AtTOR* est un gène essentiel, comme c'est le cas pour les gènes *TOR* de levure, de souris et de drosophile (Kunz *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Oldham *et al.*, 2000 ; Hentges *et al.*, 2001). Le phénotype des mutants *tor* ainsi que le profil d'expression de *AtTOR* dans les cellules où la prolifération est couplée à la croissance cytosolique nous ont amené à proposer que AtTOR aurait, comme les protéines TOR d'animaux et de levures, un rôle dans le contrôle de la croissance cellulaire par augmentation de la masse cytosolique. Cette augmentation de masse étant vraisemblablement liée à une activation de la synthèse protéique. Un modèle de l'implication de AtTOR dans les événements de croissance cellulaire et de prolifération, reprenant les arguments discutés dans l'article 1, est présenté dans la figure 42. Le phénotype embryon-létal des mutants *tor* et le profil d'expression dans tous les méristèmes primaires, suggère que l'inhibition de AtTOR à des stades post-embryonnaires conduirait à un arrêt de la croissance dans ces méristèmes. Cependant, cela reste à démontrer.

Nous avons montré, à l'aide d'une fusion traductionnelle avec le gène rapporteur *GUS* apporté par l'ADN-T, que *AtTOR* est exprimé dans les méristèmes primaires, l'embryon et l'endosperme. Ce type de fusion est fiable puisqu'elle est située au locus de *AtTOR*. Elle reflète à la fois les régulations transcriptionnelles et traductionnelles. Cependant, le transcrit de *AtTOR* a été détecté dans tous les tissus par RT-PCR quantitative. Son niveau d'expression est faible puisqu'il n'a pas été détecté par transfert de northern. De plus, il n'y a pas de différences importantes du niveau d'expression du transcrit entre les tissus dans lesquels l'activité GUS du mutant *tor1* n'est pas détectable (feuilles) et les tissus dans lesquels elle est nettement visible (cals, graines immatures). Des expériences de RT-PCR quantitative devront être réalisées afin de confirmer ce résultat. Toutefois, cela pourrait suggérer que *AtTOR* est transcrit à un faible niveau dans les tissus de la plante et qu'une régulation traductionnelle contrôle l'expression de la protéine dans les tissus méristématiques. La uORF observée dans la séquence de tête de *AtTOR* pourrait intervenir dans ce type de régulation. Une situation similaire pourrait exister chez les animaux puisque les transcrits de *mTOR* et *dTOR* ont été détectés dans tous les tissus mais les éventuelles régulations traductionnelles n'ont pas été étudiées (Brown *et al.*, 1994 ; Chiu *et al.*, 1994 ; Hentges *et al.*, 2001 ; Ernst Hafen, Zoologisches Institut, Zürich, Suisse, communication personnelle).



**Figure 42 : Modèle de l'implication de AtTOR dans les événements de croissance cellulaire et de prolifération.** La vacuole est en blanc, le cytosol est en gris.

Bien que nos résultats mettent en évidence l'importance de la voie de AtTOR, aucun élément situé en amont ou en aval de AtTOR n'est encore identifié. Les homologues des membres de la voie de TOR d'animaux et de levures présents chez *Arabidopsis* ont été décrits en introduction (chap. 2.6). Cependant, aucune évidence expérimentale ne permet de relier ces protéines à AtTOR. Il est possible que AtTOR ait un rôle dans la perception des carences nutritives au niveau des méristèmes, notamment dans la réponse à la carence en sucres qui induit l'autophagie (voire introduction, chap. 1.5).

L'analyse des membres de la voie de AtTOR bute sur un problème expérimental. En effet, le phénotype embryon-létal des mutants *tor-1* et *tor-2* limite leur analyse puisque l'arrêt de développement est trop précoce pour faire des analyses biochimiques. Un criblage de révertants est aussi difficilement envisageable car le phénotype est dissimulé par les siliques de l'hétérozygote.

La perspective de l'inhibition de AtTOR par voie pharmacologique est intéressante au vu des résultats obtenus grâce à cette molécule chez les autres organismes. Cependant, si nous confirmons que l'expression de ScFKBP12 ne suffit pas à rendre *Arabidopsis* sensible à la rapamycine, d'autres stratégies devront être utilisées pour inhiber AtTOR lors du développement post-embryonnaire. Si l'une de ces stratégies réussit, une mutagenèse pourra être réalisée afin de rechercher des revertants du phénotype.

Une possibilité serait d'essayer d'inhiber l'activité de AtTOR par sur-expression d'un domaine toxique. Un tel domaine a déjà été décrit chez *S. cerevisiae* (Alarcon *et al.*, 1999). Il s'agit d'une région d'environ 500 résidus aminoacides, située en amont du domaine FRB, qui mime l'effet de la rapamycine lorsqu'elle est sur-exprimée dans les levures. Le domaine FRB peut avoir un effet similaire puisque qu'il inhibe mTOR lorsqu'il est micro-injecté dans des cellules animales (Vilella-Bach *et al.*, 1999). L'un de ces domaines de AtTOR pourrait ainsi être sur-exprimé dans *Arabidopsis* sous le contrôle d'un système inductible afin de contrôler l'inhibition de AtTOR.

Il est aussi envisageable d'inhiber la voie de AtTOR en agissant sur l'expression du gène *AtTOR*. Ainsi, une expérience d'inhibition de l'expression de *AtTOR* par transformation d'*Arabidopsis* avec une construction permettant l'expression d'ARN double brins a été initiée au Laboratoire de Métabolisme Carboné. (Yao Lei et Christophe Robaglia, communication personnelle). Le projet de d'expression de *AtTOR* dans les tissus où il n'est pas exprimé

normalement avec le système GAL/UAS que nous avons initié pourra également donner des résultats intéressants.

Ainsi, un important effort de recherche sera encore nécessaire avant qu'un modèle de la voie de TOR de plantes puisse être établi. Les éléments de cette voie qui sont propres aux plantes seront particulièrement intéressants à étudier.

# MATERIEL ET METHODES

## 1 Matériel

### 1.1 Souches bactériennes

La souche d'*Escherichia coli* utilisée pour les clonages a le génotype suivant : F<sup>-</sup> f80 *dlacZ* ΔM15 *mcrA* Δ(*lacZYA-argF*) U169 *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *gal<sup>-</sup>* *phoA* *supE44* l<sup>-</sup> *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.

Les souches *Streptomyces hygroscopicus* proviennent de Richard Hutchinson, de l'Université du Wisconsin. La souche ATCC29253 productrice de rapamycine a été isolée par Vézina *et al.* (1975). La souche WHM165 ne produisant pas de rapamycine est une souche isogénique de ATCC29253 délétée des gènes de synthèse de la rapamycine (Lomovskaya *et al.*, 1997).

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la transformation d'*Arabidopsis* est C58C1/pMP90. Elle a été obtenue en remplaçant l'ADN-T du plasmide Ti de la souche sauvage C58 par le gène de résistance à la gentamycine (Koncz et Schell, 1986).

### 1.2 Souche de levure

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* SMY87-4, fournie par Joseph Heitman (Duke University, North Carolina) a le génotype suivant : *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 ade2 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ fpr1::hisG*. Il s'agit d'une souche PJ69-4A dans laquelle le gène codant ScFKBP12 a été délété (James *et al.*, 1996 ; Arndt *et al.*, 1999).

### 1.3 Chlamydomonas

La souche de *Chlamydomonas reinhardtii* sauvage utilisée a été fournie par Laurent Cournac (DEVM, CEA Cadarache).

### 1.4 Plantes

#### 1.4.1 *Arabidopsis thaliana*

Les mutants utilisés sont de l'écotype Wassilewskija. Les deux lignées *tor-1* et *tor-2* sont issues de la collection de mutants de Versailles obtenue par insertion d'un ADN-T (Betchold *et al.*, 1993 ; Bouchez *et al.*, 1993). Cet écotype a aussi été utilisé pour les transformations génétiques.

Le clonage de l'ADNc de *AtTOR* et les expériences de transfert de Northern et de RT-PCR semi quantitative, ainsi que la transformation avec la construction *UAS-AtTOR*, ont été réalisés à partir de l'écotype Columbia..

### 1.4.2 Autres plantes

Pour les tests de sensibilité à la rapamycine, les variétés utilisées sont Nipponbarre pour le riz (*Oryza sativa*), Xanthi D8 NN pour le tabac (*Nicotiana Tabacum*), Drakkar pour le colza (*Brassica napus*) et tomate cerise pour la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

### 1.4.3 Culture cellulaire d'*Arabidopsis*

La culture cellulaire d'*Arabidopsis* de 7 jours (Axelos *et al.*, 1992) a été fournie par Jean-Pierre Agnel et Marie-Hélène Montané (DEVM, CEA Cadarache).

## 1.5 Plasmides

Les cartes des plasmides utilisés pour les clonages sont présentées dans les figures 43 à 46.

## 2 Conditions de culture et transformations génétiques

### 2.1 Conditions de culture et transformation des bactéries

#### 2.1.1 Conditions de culture des bactéries

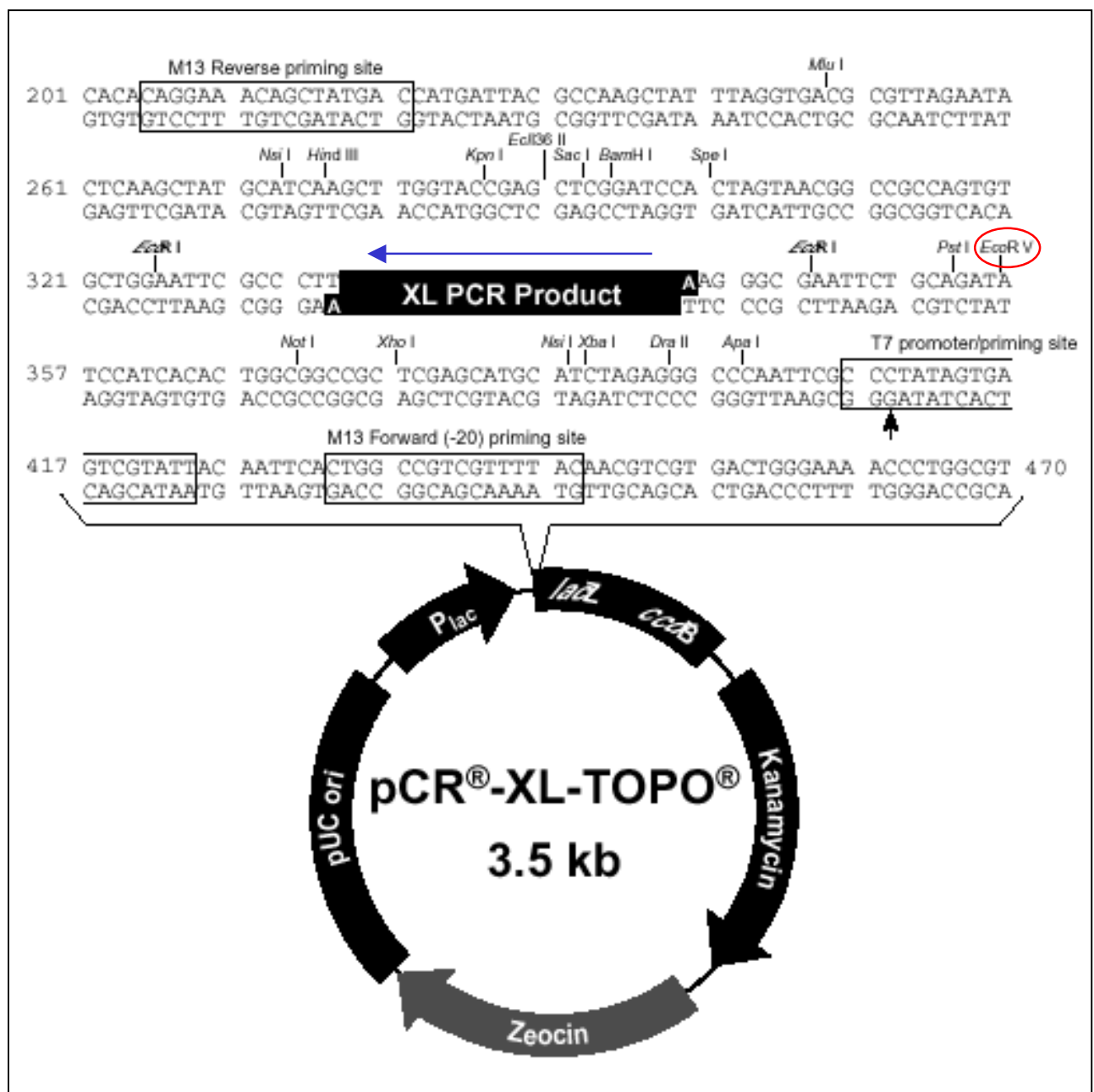
*E. coli* est cultivée à 37°C dans le milieu de Luria Bertani (LB) contenant de l'extrait de levure (5 g/l), du bacto-tryptone (10 g/l) et du NaCl (5 g/l). De l'agar à 15 g/l est ajouté pour le milieu solide.

*A. tumefaciens* est cultivée dans les mêmes conditions que *E. coli* à l'exception de la température qui est de 30°C au lieu de 37°C.

Les antibiotiques dont le gène de résistance est apporté par le plasmide sont utilisés aux concentrations suivantes pour sélectionner les bactéries transformées : ampicilline 100 µg/ml, kanamycine 50 µg/ml.

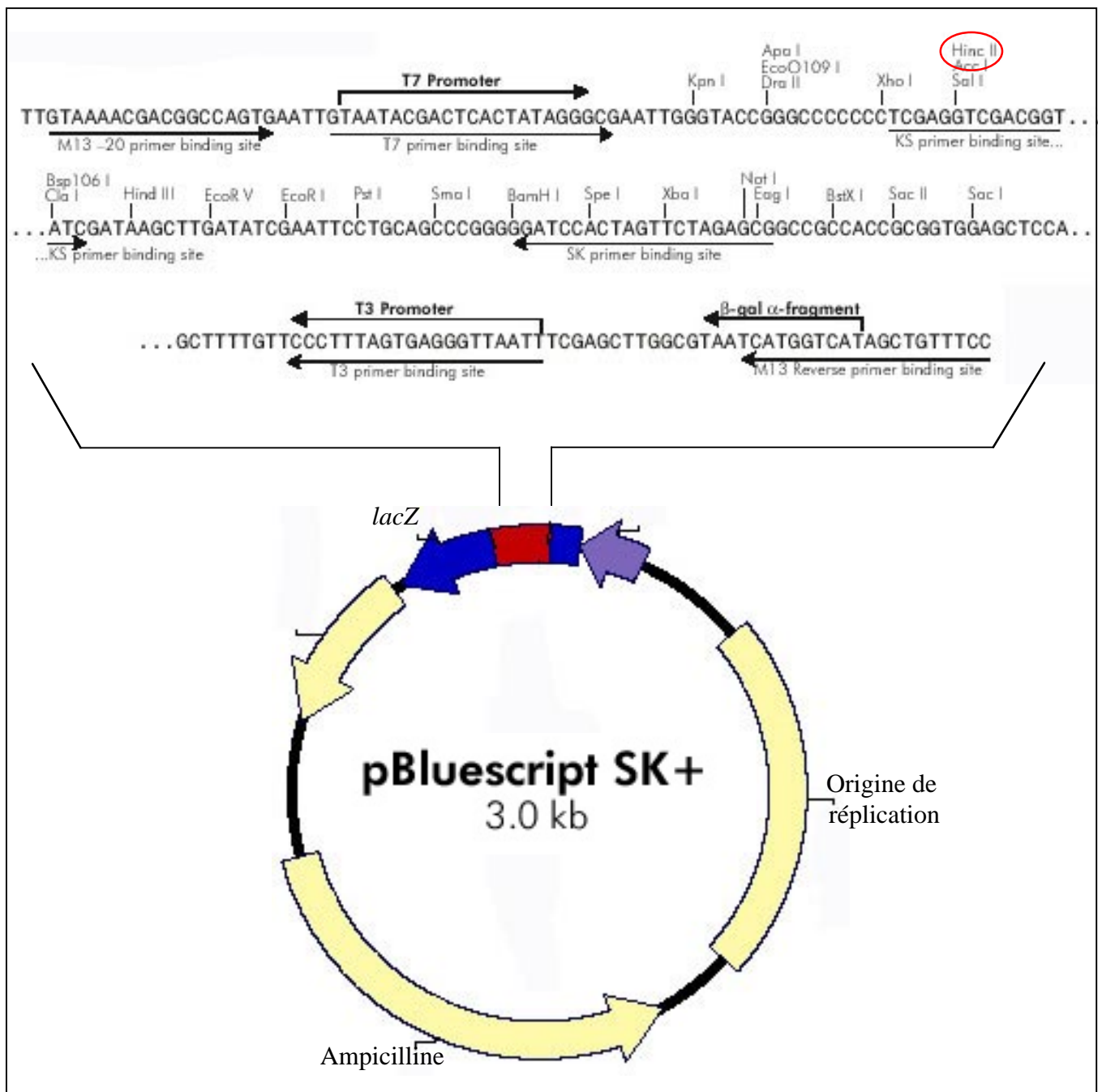
#### 2.1.2 Transformation des bactéries

Une culture (500 ml ou 1l) de la souche appropriée est réalisée à 37°C (30°C pour *Agrobacterium*) jusqu'à obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0,6. Les cellules sont alors refroidies dans la glace, lavées deux fois dans du glycérol 10 % puis le culot est resuspendu doucement dans un volume minimal (1 à 2 ml) de glycérol 10 % froid. Les bactéries sont alors aliquotées par 50 µl, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. L'efficacité des bactéries (généralement 10<sup>7</sup> transformants/µg d'ADN) est testée par transformation avec un plasmide de concentration connue. Pour la transformation, les bactéries électrocompétentes sont décongelées lentement et maintenues à 4°C. Le produit de ligature (4 µl) est mélangé aux bactéries dans des cuves à

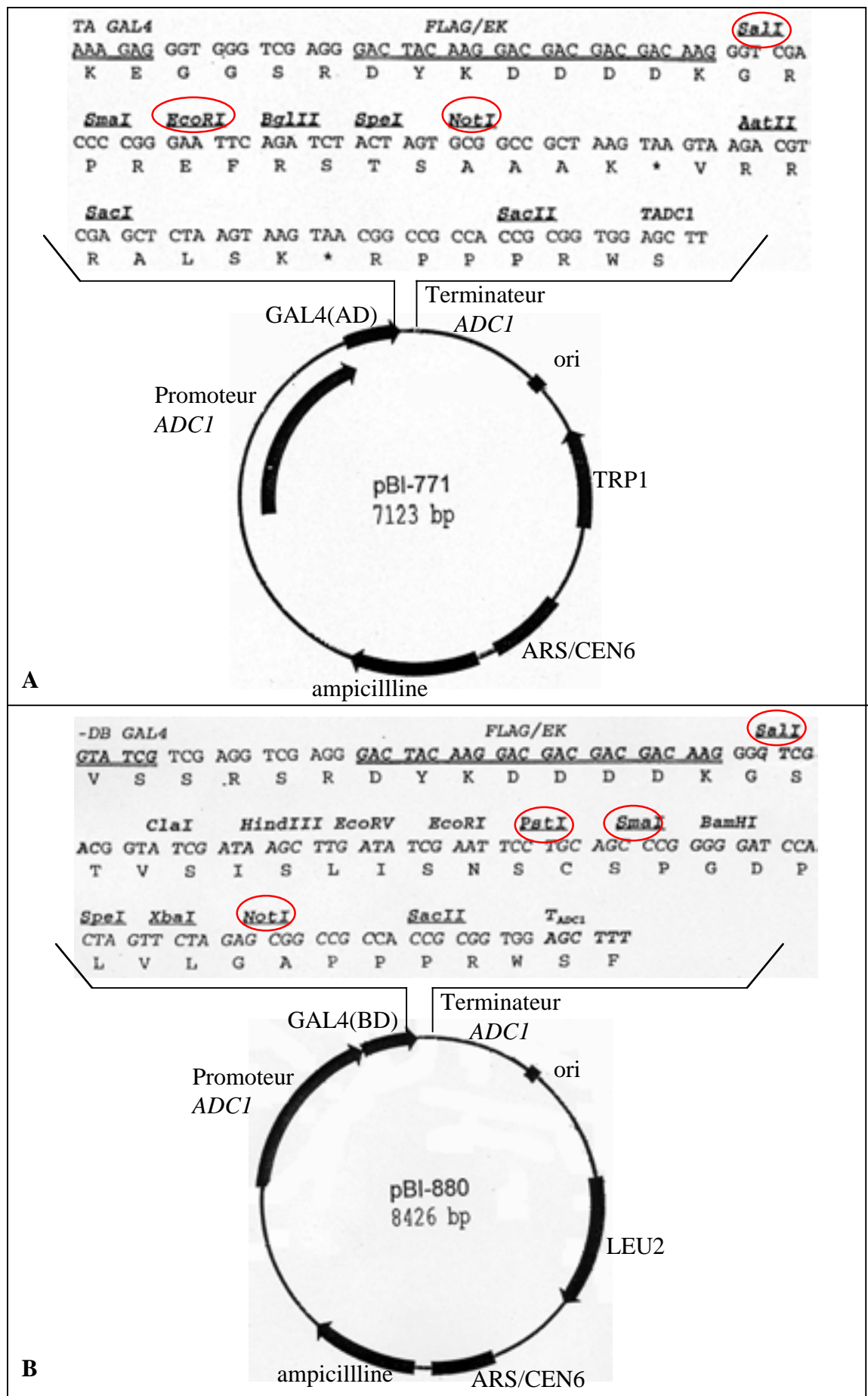


**Fig. 43 : carte du plasmide pCR-XL-TOPO (Invitrogen) utilisé pour le clonage de l'ADNc de *AtTOR*. La flèche bleue indique l'orientation de la séquence codante de *AtTOR* clonée. Le site de restriction utilisé pour le sous-clonage est entouré en rouge.**

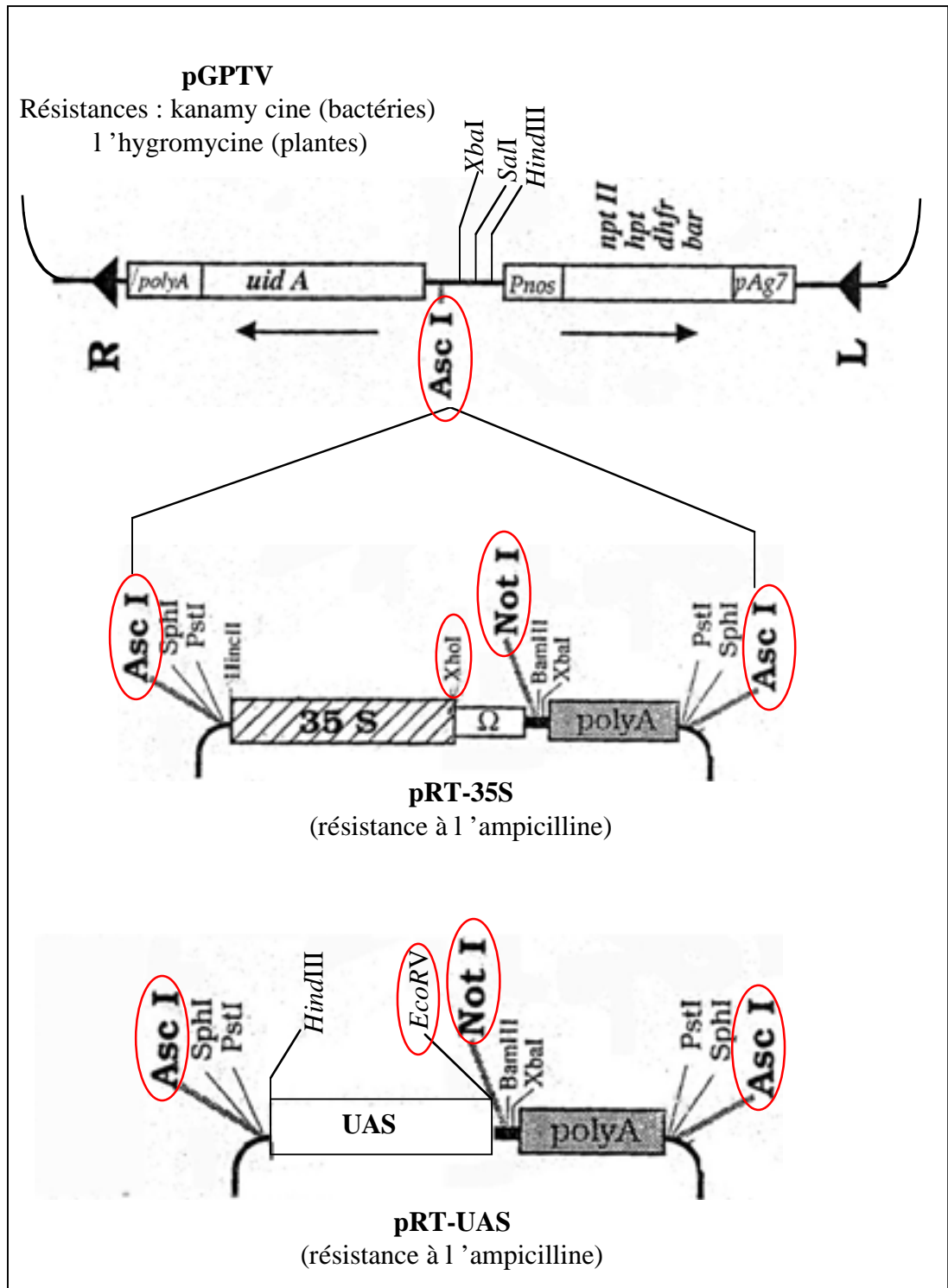




**Fig. 44 : carte du plasmide pBluescript** (Stratagene) utilisé pour le clonage et la transcription de la ribosonde. Le site de restriction utilisé pour le clonage est entouré en rouge



**Fig. 45 : carte des plasmides pBI771 (A) et pBI880 (B) utilisés pour le double hybride.** *ADC1* : gène de l'Alcool déshydrogénase I. ARS/CEN6 ; séquence autonome de réplication et séquence centromériques, pour la réplication dans la levure. Ori : origine de réplication bactérienne. Les sites de restriction soulignés sont uniques. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont entourés en rouge. D 'après Kohalmi *et al.*, 1997.



**Fig. 46 : carte des plasmides pRT et pGPTV** utilisés pour la transformation d'*Arabidopsis*. Les constructions sont réalisées dans les plasmides pRT-35S ou pRT-UAS, puis insérées dans pGPTV en utilisant l'enzyme *AscI*. Les sites de restriction utilisés pour les clonages sont entourés en rouge. D'après Überlacker et Werr, 1996. pRT-UAS a été créé et fourni par Thierry Desnos (LMV, DEVM, CEA Cadarache).

électroporation et le courant électrique est appliqué (12,5 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F). Les bactéries sont reprises dans 1 ml de milieu LB et placées à 37°C (ou 30°C) sous agitation pendant 1 h puis étalées sur des boîtes de milieu LB contenant l'antibiotique adéquat.

## **2.2 Condition de culture et transformation des levures**

### *2.2.1 Conditions de culture des levures*

La souche de levure SMY-87-4 est cultivée dans le milieu riche YPD (Extrait de levure 10 g bacto-pectone 20 g/l, glucose 20 g/l et adénine hémisulfate 30 mg/l ; Ausubel *et al.*, 1993) jusqu'à transformation. Après transformation, les levures sont sélectionnées sur milieu minimum [1,7 g/L de YNB-AA/AS (milieu pour levure sans aminoacides et sulfate d'ammonium), 5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 2 g/L de dextrose] complété avec tous les aminoacides sauf la leucine, l'uracile et le tryptophane. Enfin, les expériences de double hybride sont réalisées sur le milieu minimum dépourvu de leucine, d'uracile, de tryptophane et d'adénine.

### *2.2.2 Transformation génétique des levures*

Les levures sont cultivées dans du milieu YPD jusqu'à obtention d'une  $\text{DO}_{600}$  de 0,7. Elles sont alors lavées deux fois à l'eau stérile puis reprises dans de l'acétate de lithium (LiAc) 0,1M (1/100 du volume initial). Après incubation à 30°C (15 min), 50  $\mu$ l de levures sont mélangés avec les 3 plasmides (0,5  $\mu$ g de chacun) et 50  $\mu$ g d'ADN de sperme de saumon soniqué (dénaturé 5 min à 100°C avant emploi), puis 300  $\mu$ l de PEG/LiAc (40 % Polyéthylène glycol 3350, 0,1M LiAc) sont ajoutés. L'échantillon est alors incubé 30 min à 42°C, puis centrifugé et resuspendu dans de l'eau et étalé sur boîtes sélectives pendant 3 jours à 30°C.

## **2.3 Conditions de culture de *Chlamydomonas***

*Chlamydomonas reinhardtii* a été cultivée à 25°C dans le milieu TAP (Tris-Acetate-Phosphate) contenant de l'acétate comme source de carbone (Harris, 1989). Pour le test de sensibilité à la rapamycine, 1 unité de  $\text{DO}_{600}$  de culture a été centrifugée (3000 g, 4min) et resuspendue dans du Top agar (0,7 % agar à 40°C) puis étalée sur une boîte de pétri contenant du milieu TAP solide (15 g/l d'agar).

## **2.4 Conditions de culture des plantes et transformation génétique**

### *2.4.1 Conditions de culture d'Arabidopsis thaliana*

Pour la culture *in vitro*, la surface des graines est stérilisée 7 minutes dans une solution 9:1 éthanol 95 % et de Bayrochlore™ (BAYROL, dissolution d'une pastille dans 40 ml d'eau),

rincées deux fois à l'éthanol 95 %, puis séchées sous hotte à flux laminaire. Les graines sont semées en boîtes de pétri contenant du milieu de culture Hoagland/2 (1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.7 mM KNO<sub>3</sub>, 0.5 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.6 µM Fe, 46.2 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 9.1 µM MnCl<sub>2</sub>, 0.87 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.32 µM CuSO<sub>4</sub>, 1.03 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> ; Arnon et Hoagland, 1940). Les semis sont placés 48 heures à 4°C afin de synchroniser la germination, puis en chambre de culture avec une photopériode de 16 heures jour / 8 heures nuit, une température de 20°C jour/15°C nuit et une humidité relative de 70 %. Le transfert des boîtes de Pétri en chambre de culture correspond au jour 0 de croissance.

Les cultures en sol ont été réalisées en phytotrons sur terreau stérilisé, éclairée selon une photopériode de 16 heures de jour à 23°C et 8 heures de nuit à 17°C et irriguées avec une solution nutritive.

#### 2.4.2 Conditions de culture des autres plantes

Les graines de tomate, de colza, de riz et de tabac ont été semées *in vitro* sur milieu Gamborg B5 (SIGMA G5768) qui correspond au milieu de Murashige et Skoog (1962) additionné de myo-inositol (100 mg/l), de thiamine (10 mg/l), de pyridoxine (1 mg/l), d'acide nicotinique (1 mg/l), de MES pH 7,5 (0,5 g/l) et de d'agar (0,7 %) (Gamborg *et al.* , 1968).

#### 2.4.3 Transformation génétique d'*Arabidopsis* par *Agrobacterium tumefaciens*

Les plantes, cultivées en serre, âgées d'environ trois semaines (premières siliques développées) sont transformées *in planta* par trempages des inflorescences dans la solution de *Agrobacterium* transformées avec le plasmide contenant l'ADN-T à transférer et resuspendue dans une solution de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, saccharose 5 % et silwett 77 (50 µl/l) (Clough et Bent, 1998). Après traitement, les plantes (T0) sont placées dans un sac plastique pendant deux ou trois jours afin d'éviter la déshydratation et de favoriser la pénétration des bactéries. Après 6 à 8 semaines de culture, la descendance de ces plantes (T1) est récoltée. La surface des semences est stérilisée avant semis *in vitro*. Les transformants sélectionnés sur hygromycine (30 µl/l) sont ensuite transférés en serre. Les semences (T2) issues de l'autofécondation des plantes T1 sont utilisées pour les différentes analyses.

### 2.5 Phytohormones et rapamycine

L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D ; Sigma D8407), l'acide (+/-)-cis, trans-abscissique (ABA, Sigma A1049) et l'acide gibbéréllique A3 (GA3, Sigma G7645) et la

zéatine (Sigma Z0750) sont ajoutées au milieu à partir de solution mère conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans de l'éthanol.

La rapamycine (SIGMA R0395) est utilisée à partir d'une solution à  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ul}$  dans un mélange d'éthanol (90 %) et de tween 20 (10 %) qui est stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3 Biologie moléculaire**

#### **3.1 Réactions d'amplification en chaîne (PCR) et séquençage**

Les amorces utilisées pour les PCRs et le séquençage sont détaillées dans les tableaux 1 et 2. Les ADN polymérases Taq (Sigma) , Expand Long Template (Roche) et Expand High Fidelity (Roche) sont utilisées dans les conditions recommandées par les fournisseurs en présence de  $0,2\text{ mM}$  de dNTP et de  $10\text{ ng}$  de matrice s'il s'agit d'un plasmide, et de  $100\text{ ng}$  s'il s'agit d'ADN génomique. Les programmes de PCR sont détaillés dans le tableau 3.

Le séquençage de l'ADN est réalisé par la technique de terminaison de chaîne à l'aide du kit Perkin-Elmer « ABI PRISM BigDye ».

#### **3.2 Clonages moléculaires**

Ce chapitre présente les différentes stratégies de clonage utilisées. Les clonages sont effectués dans la souche bactérienne DH5 $\alpha$  en utilisant les techniques suivantes. Les réactions de digestion, de ligation, de déphosphorylation et de remplissage des extrémités avec le fragment de Klenow sont réalisées avec les enzymes fournies avec leur tampon (New England Biolabs). Avant ligation, l'insert et le vecteur sont purifiés. Pour cela, ils sont séparés par migration sur un gel d'agarose de concentration approprié contenant du bromure d'ethidium, puis découpés sous UV et extraits du gel à l'aide du kit QIAquick (Qiagen). Les ligatures (insertion de l'insert dans le vecteur) sont effectuées avec un rapport molaire insert/vecteur de 8/1 dans un volume de  $10\text{ }\mu\text{l}$  puis transformées dans *E. coli* selon la méthode décrite dans le chapitre 1.1.2. Les bactéries résistantes à l'antibiotique adéquat sont ensuite criblées par PCR avec les amorces qui ont servi au clonage. Quelques bactéries positives sont sélectionnées, leur ADN plasmidique est extrait avec le kit "high pure plasmid isolation kit" (Roche), analysé par digestion avec des enzymes de restriction puis séquencé afin de vérifier la présence de l'insert et l'absence de mutations qui auraient pu être introduites lors de la PCR.

Le clonage de l'ADNc de *AtTOR* dans pCR-XL-TOPO a été effectué par clonage direct du produit de PCR (TA-cloning, Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. La partie 5' ajoutée dans un deuxième temps a été amplifiée par RT-PCR à partir d'ARN de racines avec les amorces TOR 6 et TOR R6 (Tab. 1) puis clonée en amont de l'ADNc en utilisant les enzymes de

note

Nom	Séquence	Localisation	Utilisation
TOR R8	5'-CTTGGGCAGAGAGAGAGATATGT	R ; géno 159 ; ADNc 159	Seq.
TOR 6	5'-GCGATATCATGTCTACCTCGTCGC AATCTTT ( <i>EcoRV</i> )	R ; géno 232 ; ADNc 232	Clonage ADNc 5'
TOR 7	5'-CCTGCATCCATGGCTTCCCCTTC	géno 268 ; ADNc 268	Clonage ADNc, seq.
TOR R7	5'-GATCACGAACTGCTTCCTCTACGTGT	R, ; géno 671 ; ADNc 448	5' RACE
TOR R6	5'- GCCGGTATTCTTAACACAGTAAGAA	R ; géno 2523 ; ADNc 1283	Seq., 5' RACE, Clonage ADNc 5'
TOR A	5'-GCCGTTGCAGATGCTGATGTAAC	géno 3701 ; ADNc 1975	Seq.
TOR R5	5'- GCCTGTGCTAGATAATCATCGAAACA	R ; géno 3789 ; ADNc 2065	Seq.
TOR B	5'-GGAGCTGATGCCTTTAATTGTTGAA	géno 5107 ; ADNc 2451	Seq.
TOR C	5'-GCGCTTTGGATCCTCATGTGCATAA	géno 6111 ; ADNc 2672	Seq.
TOR D	5'- GCTCGCTGGCGGAGACGTGAACCAT	géno 8526 ;ADNc 3645	Seq.
TOR R4	5'- CCGCCAGCGAGCATGAATTTCTCAA	R ; géno 8538 ;ADNc 3667	Seq.
TOR E	5'-GTGAGGCTCTTATACACATAAATA	géno 10272 ; ADNc 4270	Seq.
TOR E2	5'-GTGTCTCGGCTAGATGATGGTGA	géno 11177 ; ADNc 4626	Seq., sonde E2 R3,5
TOR R3,5	5'-CACCATACTGCAATATTTGATGCTT	R ; géno 12204 ;ADNc 3667	Sonde E2 R3,5
TOR F2	5'-CGTGATGCGTTTGACAAATCTACTT	géno 13194 ; ADNc 5446	PCR (géno), seq.
FRB DH	5'-CCGAATTCATACATTCTAATAATCGT GCTGT ( <i>EcoRI</i> )	géno 13695 ; ADNc 5782	Clonage du FRBd Double hybride
TOR R3	5'-GCGAGATCACTGCTGTATTGAATAA	R ; géno 13279 ; ADNc 5531	Seq., crible T-DNA, sonde E2R3
FRB 5'	5'-GCCATATGAGGGTTGCCATACTTTG GCATG	géno 14178 ; ADNc 5998	Sonde FRB
FRB 3'	5'-GCGATCCTTAGCTAGCTGTTTGTCA ATCCG	R ; géno 14899 ; ADNc 6305	Sonde FRB
TOR R2	5'-GTCGTGAGACTGGCTAGCTGTTTGT	R ; géno 14910 ; ADNc 6317	Seq.
FRB DHR	5'-CCGCGGCCGCGAGGAAGTCTAGCTC CAAGTCA ( <i>NotI</i> )	R ; géno 15043 ; ADNc 6382	Clonage du FRBd double hybride
TORsq5'	5'-TTCCTGAAAAGGTTCCATTCCGCCT	ADNc 7070	RT semi-quantit.
TORsq3'	5'-CCAAGCATATTTACAGCCTGAAGAA	R ; ADNc 7421	RT semi-quantit.
TOR R1	5'-GCGGCCGCAAATGCAAATTAGTTGA	R ; géno 17292 ; ADNc 7747	Clonage ADNc, seq.

**Tableau 1 : séquence des amorces localisés sur *AtTOR*.** La première base 5' d'une amorce est utilisée pour son positionnement. Le début du ADNc d'*AtTOR* utilisé pour la localisation correspond à la première base obtenue par 5'RACE. La position sur le génomique (géno) débute à +1 à partir du début de la séquence correspondant à l'ADNc (initiation de la transcription). Les chiffres négatifs correspondent donc à des amorces situées dans le promoteur. R, orientation inverse ; seq, séquençage de l'ADNc ; crible T-DNA, crible de mutants de la collection de Versailles. Les sites de restriction, en italique dans la séquence, sont indiqués entre parenthèse.

nom	séquence	localisation	utilisation
Tag 5	5'-CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	T-DNA, LB	crible des mutants
Tag 3	5'-CTGATACCAGACGTTGCCCCGCATAA	T-DNA, RB	crible des mutants
Tag 6	5'-CACTCAGTCTTTCATCTACGGCA	T-DNA, LB	crible des mutants
Tag 1	5'-GGACGTAACATAAGGGACTGAC	T-DNA, RB	crible des mutants
ancrage	5'GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGI IG		5' RACE
universelle	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC		5' RACE
ACT8-3	5'-GCACTTTCCAGCAGGTATGGATCTCTAAGGCA	Actine 8	RT semi-quantitative
ACT8-4'	5'-CCGGAAGTTTCTCACATAGTGAC	Actine 8 (R)	RT semi-quantitative

**Tableau 2 : séquence des amorces utilisés non-situés sur *AtTOR*.**

Fragment amplifié	Amorces utilisées	Température d'anneau	Temps d'élongation	Nombre de cycles	Enz -yme
ADNc de <i>AtTOR</i>	TOR R1 et TOR 7	65°C	9 min	30	L. T.
3' du gène <i>AtTOR</i>	TOR F2 et TOR R1	56°C	3 min	35	H. F.
Crible des mutants	Variable	65 à 55°C, 10 cycles puis 55°C, 35 cycles	2 min	45	Taq
Bordure gauche <i>tor-1</i>	TOR R3 et TAG 5	56°C	3 min	35	Taq
Bordure gauche <i>tor-2</i>	TOR R3 et TAG 5 ou TAG 6	56°C	2 min	35	Taq
Sonde TOR FRB (geno)	FRB 5' et FRB 3'	56°C	1 min	30	Taq
5' RACE 1 <sup>ère</sup> PCR	Ancrage et TOR R6 ou TOR R7	55°C	1 min 30 s	35	Taq
5' RACE 2 <sup>ème</sup> PCR	universelle et TOR R6 ou TOR R7	55°C	1 min 30 s	35	Taq
5' de l'ADNc	TOR 6 et TOR R6	56°C	1 min	25	H. F.
Sonde TOR D/R3	TOR D et TOR R3	56°C	3 min 40 s	35	Taq
Sonde TOR E2/R3,5	TOR E et TOR R3,5	56°C	2 min	35	Taq
Sonde, Rt semi-quant	ACT8-3 et ACT8-4	55°C	30 s	35, variable	Taq
Sonde, Rt semi-quant	TORsq5' et TORsq3'	55°C	30 s	35, variable	Taq

**Tableau 3 : conditions de PCR utilisées.** Dans tous les cas, les cycles sont précédés de 2 min de dénaturation à 94°C. Un cycle de PCR comprend une étape de dénaturation de l'ADN (94°C, 20 s), une étape de d'anneau (température indiquée dans la 3<sup>ème</sup> colonne, 20s) et une étape d'élongation (72°C pour Taq, 68°C pour Long Template, durée indiquée dans le 4<sup>ème</sup> colonne). Taq, ADN polymérase de *Thermophilis aquaticus* ; L. T. (Expand Long Template) : préparation pour amplification de grands fragments d'ADN (Roche Molecular Biology) ; H. F. (Expand High Fidelity) : préparation pour amplification fidèle de fragments d'ADN (Roche Molecular Biology).



restriction *EcoRV* et *AgeI* (située dans l'ADNc, 1216 pb après le site d'initiation de la transcription).

Pour les transformations *in planta*, les plasmides pRT et pGPTV ont été utilisés (Überlacker et Werr, 1996). Les fragments d'ADN sont d'abord sous-clonés dans le plasmide pRT, puis le fragment de pRT compris entre les sites de restriction *AscI* est cloné au site *AscI* du vecteur binaire pGPTV.

Pour cloner le promoteur de *AtTOR*, un fragment correspondant à 2580 pb en aval de l'ATG initiateur a été amplifiée avec les amorces promot 1 et promot 2 (Tab. 1), puis digéré avec les enzymes *EcoRV* et *NotI* et cloné dans le vecteur pRT-UAS digéré avec ces mêmes enzymes. La séquence codante de *ScFKBP12* a été amplifiée à partir du plasmide pSBH1 et des amorces 5'-ScFKBP12 et 3'-ScFKBP12 (Tab. 2), puis digérée par les enzymes *EcoRV* et *NotI* et introduite en aval du promoteur de *AtTOR*. La GFP utilisée a été extraite du plasmide 35S-I $\beta$ -gfp<sub>rs</sub> (fourni par Thierry Desnos, LMC, DEVM, CEA Cadarache) avec les enzymes *BglIII* et *EcoRI*, traitée au fragment de Klenow est clonée aval du promoteur de *AtTOR* en utilisant le site *EcoRV*.

La séquence codante de *AtTOR* a été placée en aval du promoteur 35S en coupant l'ADNc cloné dans pCR-XL-TOPO avec les enzymes *EcoRV* (site apporté lors du clonage de la partie 5') et *NotI* (site apporté par l'amorce TOR 7) puis en l'insérant dans pRT digéré avec l'enzyme *XhoI*, traité à la Klenow (afin de remplir les extrémités cohésives) puis digérée avec *NotI* et déphosphorylé. La séquence codante de *AtTOR* digérée par *EcoRV* et *NotI* a également été clonée dans les sites *EcoRV* et *NotI* de pRT-UAS. De plus, la séquence codante de *ScFKBP12* amplifiée à partir du plasmide pSBH1 avec les amorces 5'-ScFKBP12 et 3'-ScFKBP12 (Tab. 2), et digérée par *EcoRV* et *NotI* a été insérée dans pRT traité par *XhoI*, et la Klenow, puis par *NotI*, afin de créer la construction 35S-ScFKBP12.

La construction GAL4(BD)::AtFKBP12 obtenue par insertion de la séquence codante de *AtFKBP12* en phase avec GAL4(BD) dans les sites *SalI* et *NotI* de pBI880 a été fournie par Jean-Denis Faure (Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA de Versailles). Pour la construction GAL4(AD)::AtFKBP12, la séquence codante de *AtFKBP12* a été sortie du plasmide décrit précédemment en le digérant avec *SalI*, puis en créant des extrémités franches avec le fragment de Klenow et en digérant avec *NotI*. Le fragment ainsi produit a été inséré dans pBI771 traité avec les mêmes enzymes.

Pour la construction GAL4(BD)::ScFKBP12, la séquence codante de *ScFKBP12* a été exisée du plasmide pSBH1 (Cardenas *et al.*, 1994) digéré avec *BamHI* et traité à la Klenow, puis insérée dans pBI880 digéré par *SmaI*. De plus, la séquence codante de *ScFKBP12*, amplifiée à partir du plasmide pSBH1 avec les amorces 5'-ScFKBP12 et 3'-ScFKBP12 (Tab. 2) et digérée par *EcoRV* et *NotI*, a été insérée dans pBI771 digéré avec *SalI*, puis traité par le fragment de Klenow et par *NotI*, pour créer la construction GAL4(AD)::ScFKBP12.

Les constructions GAL4(BD)::AtFKBP15-1, GAL4(BD)::AtFKBP15-2 et GAL4(BD)::AtFKBP62 ont été obtenues en amplifiant les séquences codantes des gènes

correspondants à partir d'une banque d'ADNc de plantules d'*Arabidopsis* (Minet *et al.*, 1992) en utilisant les amorces décrites dans les tableaux 2 et 3, puis en les digérant avec *Pst*I et *Not*I, puis en les clonant dans pBI880 digéré avec les mêmes enzymes.

La construction GAL4(AD)::AtFRB a été obtenue en amplifiant le FRB à partir de l'EST W43444 avec les amorces FRB DH et FRB DHR (Tab. 1) puis en le digérant avec *Eco*RI et *Not*I avant de l'insérer dans pBI771 digéré avec les mêmes enzymes. Pour la construction GAL4(BD)::AtFRB, le FRB a été isolé du plasmide décrit précédemment en le linéarisant avec *Sal*I, puis en le traitant à la Klenow et en digérant avec *Not*I. Le fragment ainsi produit a été inséré dans pBI880 traité avec les mêmes enzymes.

### 3.3 5' RACE

L'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc de *AtTOR* a été réalisée avec le kit "5' RACE system amplification of cDNA ends, version 2.0" (Life Technologies).

### 3.4 Double hybride

Le protocole de double hybride est détaillé dans la partie "Materiel and methods" de l'Article 1. Les transferts de Western ont été réalisés selon les recommandations fournies avec les anticorps dirigés contre GAL4(AD) et GAL4 (BD) (Clontech).

### 3.5 Extractions d'acides nucléiques de plantes

#### 3.5.1 Extraction d'ADN à partir d'inflorescences d'*Arabidopsis*

Les échantillons (1 à 2 inflorescences) sont broyés en présence de 600 µl de tampon SDS/protéinase K (0,1M Tris-HCL, pH 8,2, 50 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 2 % SDS, 0,1 mg/ml protéinase K). Ils incubent 10 minutes à 37°C puis 500 µl de phénol-chloroforme-isoamylalcool (25 : 24 : 1) équilibré avec du TE (Tris-EDTA) 0,1 M NaCl est ajouté. Les échantillons sont ensuite homogénéisés 5 minutes à 37°C puis centrifugés 5 minutes à 10000 g. Le surnageant est alors prélevé et 50 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 500 µl d'isopropanol lui sont ajoutés. Après agitation, puis centrifugation (1 min, 10000 g), le culot est resuspendu dans 500 µl d'eau auxquels sont ajoutés 50 µl d'acétate de sodium 3M et 500 µl d'éthanol 100 %. Après homogénéisation et centrifugation (1 min, 10000 g), les culots sont séchés et repris dans 50 µl de TE. 5 µl de la préparation d'ADN sont digérés puis séparés sur gel d'agarose en vue d'un transfert de Southern.

#### 3.5.2 Extraction d'ARN totaux d'*Arabidopsis*

Le protocole utilisé est basé sur la précipitation des ARN au LiCl (Verwoerd *et al.*, 1989). Le matériel végétal (2 g) est broyé dans de l'azote liquide puis transvasé dans un tube

contenant un mélange de 750 µl de phénol et 750 µl de tampon TLES (Tris 100 mM, LiCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% , pH 8). Après agitation, 750 µl de chloroforme isoamylalcool (24 : 1) sont ajoutés. Une nouvelle agitation de 30 s est effectuée puis les échantillons sont centrifugés 5 min. à 10000 g. Le surnageant est prélevé puis additionné d'un volume égal de LiCl 4M et placé à 4°C pendant une nuit. Une centrifugation de 30 min à 10000g est alors réalisée. Le culot obtenu est repris dans 250 µl d'eau puis 25 µl d'acétate de sodium (pH 5,6) et 500 µl d'éthanol sont ajoutés. Les échantillons sont alors placés 1 heure à 80°C puis centrifugés 30 min à 10000 g. Le culot est ensuite lavé à l'éthanol 70 % puis repris dans 50 µl d'eau. La concentration des ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

### 3.5.3 *Extraction d'ARN poly A+ d'Arabidopsis*

Les ARN poly A+, enrichis en ARNm ont été purifiés avec le kit "PolyAtract System 1000 (Promega).

## 3.6 **Transfert de Southern**

### 3.6.1 *Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose et transfert sur membrane*

Après digestion par l'enzyme de restriction, les fragments d'ADN génomique sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %) dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM) en présence de bromure d'éthidium (BEt) 0,02 %. Après migration, les fragments peuvent être transférés sur une membrane de Nylon. Pour cela, le gel d'ADN est soumis à des traitements successifs avec une solution de dépurination (HCl 0,25 N, 30 min) puis une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M, 2 fois 20 min) et enfin une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, 2 fois 20 min). L'ADN est alors transféré sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia) par capillarité avec du tampon SSCx10 (SSC : NaCl 150 mM, citrate trisodique 15 mM, pH 7) durant une nuit. La membrane est ensuite soumise à une irradiation aux UV pendant 2 min de façon à y fixer l'ADN. La membrane peut être stockée sèche ou utilisée directement pour l'hybridation.

### 3.6.2 *Marquage de sondes et hybridation des membranes*

Les sondes sont marquées avec du <sup>32</sup>P-dCTP (50 µCi) par amorçage aléatoire en utilisant le kit "Mega Prime DNA Labelling System" (Amersham Pharmacia), selon les indications du fournisseur en utilisant 50 ng d'ADN purifié sur gel comme matrice. Un aliquot de chaque sonde marquée est précipité au TCA afin de vérifier l'incorporation de la radioactivité au compteur Geiger.

Les membranes obtenues après transfert sont ensuite pré-hybridées dans le tampon d'hybridation (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3M, SDS 7 %, EDTA 1mM, albumine de sérum bovin 1 %) à 65 °C pendant 1 h. La sonde marquée est dénaturée à 100°C pendant 2 min et alors ajoutée à la membrane puis une incubation d'une nuit à 65°C est réalisée dans un four à hybridation. La

membrane est ensuite lavée plusieurs fois dans le tampon de lavage ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,3M, SDS 7 %) à 65°C.

### 3.6.3 *Hybridation des produits de PCR lors du criblage des mutants de la collection de Versailles*

Le protocole de transfert de Southern utilisé lors du criblage des mutants de Versailles est décrit en détail par Granier *et al.*, (1999). La principale différence avec le protocole décrit précédemment réside dans le fait que l'ADN est transféré simultanément sur deux membranes de nylon disposées de part et d'autre du gel d'agarose.

## 3.7 **Transfert de Northern**

### 3.7.1 *Séparation des ARNs sur gel d'agarose et transfert sur membrane*

Les ARN sont fractionnés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %), dans un tampon composé de tampon MOPS (morpholinopropane-sulfonate 20 mM, acétate de sodium 10 mM, d'EDTA 1 mM) en présence de formaldéhyde (2 %). Avant électrophorèse, les échantillons sont incubés 10 min à 65°C dans du tampon de dénaturation contenant du tampon MOPS, de la formamide (45 %), de la formaldéhyde (6 %), de l'EDTA (0,5 M), du bromure d'éthidium (0,02 mg/ml), du glycerol et du bleu de bromophénol. Après migration, les ARN sont transférés sur une membrane de Nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia) par capillarité en solution alcaline NaOH 20 mM pendant 3h. Le transfert des ARN est vérifié sous UV.

### 3.7.2 *Marquage de la sonde par transcription en présence d'UTP radioactif*

Afin de réaliser une ribosonde, un fragment de 600 pb de l'ADNc de *AtTOR* contenant le domaine FRB a été purifié à partir de l'EST W43444 digérée avec *HincII*, et inséré dans pBluescript digéré par la même enzyme et déphosphorylé. La sonde marquée a été réalisée par transcription avec le kit "Megascript T7" (Ambion) en présence de  $^{32}\text{P}$ -UTP (50  $\mu\text{Ci}$ ). Un aliquot de la sonde a été précipité au TCA afin de vérifier l'incorporation de la radioactivité au compteur Geiger.

### 3.7.3 *Hybridation et révélation*

Les membranes obtenues après transfert sont préhybridées dans le tampon d'hybridation (Formamide 50 %, SDS, 7 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,25M, héparine 100  $\mu\text{g/ml}$ , EDTA 2mM) à 65 °C pendant 1 h. La sonde marquée est alors ajoutée à la membrane puis une incubation d'une nuit à 65°C est réalisée dans un four à hybridation. La membrane est ensuite lavée plusieurs fois dans le tampon de lavage (0,2 SSC,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M, SDS 2 %) à 65°C. Les signaux sont détectés à l'aide d'un Phosphoimager (Storm 860).

### 3.8 RT-PCR semi quantitative

1 µg d'ARN totaux est utilisé pour les RT (transcription inverse) réalisées avec l'enzyme RTAMV (Roche) selon les recommandations du fournisseur en utilisant l'amorce 5'-T(15). Les PCR sont ensuite effectuées à partir d'1 µl de produit de RT dilué 10 fois avec les amorces spécifiques ACT8-3, ACT8-4, TORsq5' et TORsq3' (Tab. 1 à 3) qui amplifient des fragments de même taille. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose à 1,5 %. Le transfert de l'ADN sur membrane, le marquage des sondes (à partir de produits de PCR amplifiés avec les amorces spécifiques citées précédemment) et l'hybridation ont été réalisés comme dans le paragraphe 1.6. Les signaux sont détectés au Phosphoimager (Storm 860).

## 4 Histologie

Les protocoles des colorations GUS et des observations en Nomarski, sont détaillés dans la partie "Materiel and methods" de l'Article 1.

Le protocole de la coloration de Feulgen est adapté de Braselton *et al.*, (1996). Les graines extraites de siliques immatures disséquées sont fixées dans un mélange d'acide acétique et d'éthanol (1/3) pendant 12h. Les échantillons sont ensuite rincés à l'éthanol absolu puis une série de réhydratation dans des solution d'éthanol a 90, 70, 50 et 30 % puis dans de l'eau est effectuée (1h pour chaque bain). Une hydrolyse acide est alors réalisée dans de l'HCl 5M (1h). Après 3 lavages à l'eau, un traitement au réactif de Schiff (Sigma, Réactif de Schiff) est réalisé (3h).les échantillons sont ensuite lavés puis une série de déshydratations dans des solution d'éthanol a 30, 50, 70 et 90 % puis dans de l'éthanol absolu est effectuée. Les graines sont imprégnées par la résine « LR White Medium grade » (Agar), d'abord dans un mélange éthanol/résine 1:1 (1h). puis par trois bains dans la résine pure (1h, 1h et 12h). Enfin les échantillons sont montés sur lame dans une goutte de résine et recouverts d'une lamelle. La polymérisation de la résine à lieu à 60°C. (12h) puis la lamelle est enlevée. Les observations en immersion a huile sont réalisées avec une excitation à 488 nm et une émission à 510 nm (long pass).

## 5 Bio-informatique

Les alignements simples présentés dans la figure 1 de l'article 1 ont été réalisés avec le logiciel BLAST du NCBI (National Center for Biotechnology Information) disponible à l'adresse internet : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi> (Altschul *et al.*, 1990).

Pour les alignements multiples, le logiciel Multalign développé par l'INRA de Toulouse a été utilisé (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> ; Corpet, 1988).

Les répétitions HEAT ont été identifiées avec le logiciel d'identification des REP accessible sur le site du l' « European Molecular Biology Laboratory » : <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/papers/rep/> (Andrade *et al.* , 2000).

La prédiction de promoteur a été effectuée avec le programme PROSCAN version 1.7 (<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/proscan/function.html> ; Prestridge, 1995).

La base de donnée du TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <http://www.arabidopsis.org/>) a été utilisé pour les recherches de séquences dans le génome d'*Arabidopsis*. Pour les autres plantes, c'est la banque de donnée du TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) qui a été utilisée.

Toutes les autres manipulations de séquences d'ADN, dont l'alignement de la séquence de l'ADNc avec la séquence génomique de *AtTOR*, ont été réalisées avec le logiciel DNA Strider<sup>TM</sup> 1.3 développé par le CEA de Saclay.

Les séquences nucléotidiques et protéiques citées sont disponibles par leur numéro d'accès sur le site du NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

## REFERENCES

- Alarcon, C. M., Cardenas, M. E. et Heitman, J. (1996) Mammalian RAFT1 kinase domain provides rapamycin-sensitive TOR function in yeast. *Genes Dev.* 10, 279-288.
- Alarcon, C. M., Heitman, J. et Cardenas, M. E. (1999) Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 2531-2546.
- Albig, A. R. et Decker, C. J. (2001) The target of rapamycin signaling pathway regulates mRNA turnover in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12, 3428-3438.
- Altmann, M., Schmitz, N., Berset, C. et Trachsel, H. (1997) A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J.* 16:1114-1121.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- An, Y. Q., McDowell, J. M., Huang, S., McKinney, E. C., Chambliss, S. et Meagher, R. B. (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10 (1), 107-121.
- Andrade, M. A. et Bork, P. (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* 11, 115-116.
- Andrade, M. A., Ponting, C. P., Gibson, T. J. et Bork, P. (2000) Homology-based method for identification of protein repeats using statistical significance estimates. *J. Mol. Biol.* 298, 521-537.
- The *Arabidopsis* initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Arndt, C., Cruz, M.C., Cardenas, M. E. et Heitman, J. (1999) Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 145, 1989-2000.
- Arnon, D. I. et Hoagland, D. R. (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of organic nutrients. *Soil. Sci.* 50, 463-483.
- Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., Marty-Mazars, D., Barrieu, F., Alabouvette, J., Marty, F et Douce, R. (1996). Ultrastructure and biochemical characterisation of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.* 133, 1251-1263.
- Axelos, M., Curie, C., Mazzolini, L., Bardet, C., Lescure, B. (1992) A protocol for transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant. Physiol. Biochem.* 30, 123-128.
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. et Doolittle, W. F. (2000) A Kingdom-level phylogeny of eucaryotes based on combined protein data. *Science* 290, 972-977.
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F. et Hall, M. N. (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell* 7, 25-42.
- Baskin, T. I. et Wilson, J. E. (1997) Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol.* 113, 493-502.

- Bechtold, N., Ellis, J. et Pelletier, G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C. R. Acad. Sci. Paris 316, 1194-1199.
- Beck, T. et Hall, M. N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. Nature 402, 689-692.
- Beck, T., Schmidt, A. et Hall, M. N. (1999) Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophane permease in yeast. J. Cell Biol. 146, 1127-1237.
- Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N., et Sonenberg, N. (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and cap-dependent initiation of translation. EMBO J. 15, 658-664.
- Berger, F (1999) Endosperm development. Curr. Opin. Plant Biol. 2, 28-32.
- Berriman, M. et Fairlamb, A. H. (1998) Detailed characterization of cyclophilin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Biochem. J. 334, 437-445.
- Berset, C., Trachsel, H. et Altmann, M. (1998) The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4264-4269.
- Bertram, P. G., Zeng, C., Thorson, J., Shaw, A. S., et Zheng, X. F. (1998) The 14-3-3 proteins positively regulate rapamycin-sensitive signaling. Curr. Biol. 8, 1259-1267.
- Blommaert, E. F., Luiken, J. J., Blommaert, P. J., van Woerkom, G. M. et Meijer, A. J. (1995) Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 270, 2320-2326.
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J. et Yancopoulos, G. D. (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat. Cell Biol. 3, 1014-1019.
- Boisnard-Lorig, C., Colon-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E., Dumas, C., Haseloff, J. et Berger, F. (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. Plant Cell 13, 495-509.
- Bonatti, S., Simili, M., Galli, A., Bagnato, P., Pigullo, S., Schiestl, R. H. et Abbondandolo, A. (1998) Inhibition of the Mr 70 ,000 S6 kinase pathway by rapamycin results in chromosome malsegregation in yeast and mammalian cells. Chromosoma 107, 498-506.
- Bosotti, R., Isacchi, A. et Sonnhhammer, E. L. L. (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases. Trends Biochem. Sci. 25, 225-227.
- Bouchez, D., Camilleri, C. et Caboche, M. (1993) A binary vector based on basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. C. R. Acad. Sci. Paris 316, 1188-1193.
- Bouchez, D. et Höfte, H. (1998). Functional genomics in plants. Plant Physiol. 118, 725-732.
- Bowman, J. L. et Eshed, Y. (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. Trends Plant Sci. 8, 110-115.
- Braselton, J. P., Wilkinson, M. J. et Clulow, S. A. (1996) Feulgen staining of intact plant tissues for confocal microscopy. Biotech. Histochem. 71, 84-87.
- Brennan, P., Babbage, J. W., Thomas, G. et Cantrell, D. (1999) P70<sup>S6k</sup> integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes. Mol. Cell. Biol. 19, 4729-4738.



- Britton, J. S. et Edgar, B. A. (1998) Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* 125, 2149-2158.
- Brouquisse, R., Gaudillère, J.-P. et Raymond, P. (1998) Induction of a carbon-starvation-related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness. *Plant Physiol.* 117, 1281-1291.
- Brown, E. L., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W. S. et Schreiber, S. L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756-758.
- Brown, E. J., Beal, P. A., Keith, C. T., Chen, J., Shin, T. B. et Schreiber, S. L. (1995) Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 377, 441-446.
- Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence Jr., J. C. et Abraham, R. T. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* 15, 5256-5267.
- Brunn, G. J., Hudson, C. C., Sekulic, A., Williams, J. M., Hosoi, H., Houghton, P. J., Lawrence Jr., J. C. et Abraham, R. T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, 99-101.
- Burnet, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H. et Sabatini, D. M. (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1432-1437
- Cafferkey, R., M., cLaughlin, M. M., Young, P. R., Johnson, R. K., and Livi, G. P. (1994) Yeast TOR (DRR) proteins: Amino-acid sequence alignment and identification of structural motifs. *Gene* 141:133-136.
- Cardenas, M.E., Hemenway, C., Muir, R. S., Ye, R., Fiorentino, D. et Heitman, J. (1994) Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.* 13, 5944-5957.
- Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J., et Heitman, J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13, 3271-3279.
- Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. et Kahn, C. R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4902-4911.
- Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J., et Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4947-4951.
- Chen, J. Peterson, R. T. et Schreiber, S. L. (1998)  $\alpha 4$  associates with protein phosphatases 2A, 4 and 6. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 247, 827-832.
- Chiu, M. I., Katz, H. et Berlin, V. (1994) RAP1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12574-12578.
- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L. et Clardy, J. (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273, 239-242.
- Choi, J H., Adams, N. R., Chan, T.F., Zeng, C., Cooper, J. A. et Zheng, S. (2000) TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr. Biol.* 10, 861-864.

- Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R. et Blenis, J. (1992) Rapamycin–FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kD S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227–1236.
- Chung, J., Grammer, T. C., Lemon, K. P., Kazlauskas, A. et Blenis, J. (1994) PDGF- and insulin-dependent pp70<sup>s6k</sup> activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370, 71–75.
- Clark, S. E. (2001) Cell signalling at the shoot meristem. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 276–284.
- Clough, S. J. et Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- Cockcroft, C. E., den Boer, B. G. W., Healy, J. M. S. et Murray, J. A. H. (2000) Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405, 575–579.
- Conlon, I., and Raff, M. (1999) Size control in animal development. *Cell* 96, 235–244.
- Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Cosentino, G. P., Schmelzle, T., Haghighat, A., Helliwell, S. B., Hall, M. N., et Sonenberg, N. (2000). Eap1p, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4604–4613.
- Cosgrove, D. J. (1997) Relaxation on a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9, 1031–1041.
- Cosgrove, D. J. (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321–326.
- Crespo, J. L., Daicho, K., Ushimaru, T. et Hall, M. N. (2001) The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276, 24441–24444.
- Cruz, M. C., Cavallo, L. M., Gorlach, J. M., Cox, G., Perfect, J. R., Cardenas, M. E. et Heitman, J. (1999) Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with FKBP12 and TOR kinase homologs in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4101–4112.
- Cutler, N. S., Pan, X., Heitman, J. et Cardenas, M. E. (2001) The TOR Signal Transduction Cascade Controls Cellular Differentiation in Response to Nutrients. *Mol. Biol. Cell* 12, 4103–4113.
- Daga, R. R. et Jimenez, J. (1999) Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase : a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J. Cell. Sci.* 112, 3137–3146.
- Datar, S.A., Jacobs, H. W., de la Cruz, A. F. A., Lehner, C. F. et Edgar, B. A. (2000) The *Drosophila* cyclin D-Ddk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J.* 19, 4543–4554.
- Deak M., Casamayor, A., Currie, R. A., Downes, C. P. et Alessi, D. R. (1999) Characterisation of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett.* 451, 220–226.
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C. et Thomas, G. (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102–1105.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. et Inzé, D. (2001a) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1653–1668.
- De Veylder, L., Beemster, G. T. S., Beeckman, T. et Inzé, D. (2001b) CKS1At overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J.* 25, 617–626.

- Di Como, C. J. et Arndt, K. Y. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* 10, 1904-1916.
- Doerner, P., Jørgensen, J.-E., You, R., Steppuhn, J. et Lamb, C. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380, 520- 523.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. et Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119, 71-84.
- Donnelly, P. M., Bonetta, D., Tsukaya, H. et Dengler, R. E. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 215, 407-419.
- Drews, G. N., Lee, D. et Christensen, C. A. (1998) Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell* 10, 5-17.
- Duboule, D. et Wilkins, A. S. (1998) The evolution of "bricolage". *Trends Genet.* 14, 54-59.
- Dworkin, J. et Losick, R. (2001) Linking nutritional status to gene activation and development. *Genes Dev* 15, 1051-1054.
- Earp, D. J., Lowe, B. et Baker, B. (1990) Amplification of genomic sequences flanking transposable elements in host and heterologous plants: a tool for transposon tagging and genome characterization. *Nucl. Acids Res.* 18, 3271-3279.
- Edgar, B. E. et Lehner, C. F. (1996) Developmental control of the cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* 274, 1646-1652.
- Emans, N., Zimmermann, S. et Fischer, R. (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* 14, 71-86.
- Fang, Y, Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. et Chen, J. (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-1945.
- Faure, J.-D., Gingerich, D. et Howell, S. H. (1998) An *Arabidopsis* immunophilin, AtFKBP12, binds to AtFIP37 (FKBP interacting protein) in an interaction that is disrupted by FK506. *Plant J.* 15, 783-789
- Ferreira, P., Hemerly, A. S., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G. et Inzé, D. (1994) Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *Plant cell* 6, 1763-1774.
- Freire, M. A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K. S. et Robaglia, C. (2000) Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 44, 129-140.
- Fox, H. L., Pham, P. T., Kimball, S. R., Jefferson, L. S. et Lynch, C. J. (1998) Amino acid effect on translational repressor 4E-BP1 are mediated primarily by L-leucine in isolated adipocytes. *Am. J. Physiol.* 275, C1232-C1238.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Robertson, M. et Sundberg, E. (2001) The *Arabidopsis* protein SHI represses gibberellin responses in *Arabidopsis* and barley. *Plant Physiol.* 127, 937-948.
- Gaal, T., Bartlett, M. S., Ross, W., Turnbough Jr., C. L. et Gourse, R. L. (1997) Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* 278, 2092-2097.
- Galloni, M. et Edgar, B. A. (1999) Cell-autonomous and non-autonomous growth defective mutants of *Drosophila melanogaster*. *Development* 126, 2365-2375.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. et Ojima, K. (1968) Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151.
- Garcia, V., Salanoubat, M., Choisine, N. et Tissier, A. (2000) An *ATM* homologue from

- Arabidopsis thaliana*: complete genomic organisation and expression analysis. Nucl. Acids Res. 28, 1692-1699.
- Garcia Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. et Sanchez de Jimenez, E (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. Biochem. J. 358, 95-100.
- Gelvin, S. B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 51, 223-256.
- Gidekel, M., Jimenez, B., Herrera-Estrella, L. (1996) The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1-beta contains an enhancer-like element. Gene 170, 201-206.
- Gingras, A.-C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N. et Hay, N. (1996) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. Genes Dev. 12, 502-513.
- Gingras, A.-C., Raught, B. et Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. Genes Dev. 15:807-826.
- Goyer, C., Altmann, M., Lee, H. S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford Jr., J. L., Trachsel, H. et Sonenberg, N. (1993) *TIF4631* and *TIF4632*: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. Mol. Cell. Biol. 13, 4860-4874.
- Graber, J. H., Cantor, C. R., Mohe, S. C. et Smith, T. F. (1999) *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14055-14060.
- Granier, F., Bouché, N. et Bouchez, D. (1999) reverse genetic in *Arabidopsis*. In Practical course on genetic and molecular analysis of *Arabidopsis*. EMBO course. Internet : <http://www.cnrs-gif.fr/isv/EMBO/manuals/pdf/ch6.pdf>
- Groves, M. R., Hanlon, N., Throwski, P., Hemmings, B. A. et Bartford, D. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. Cell 96, 99-110.
- Haber, A. H. (1962) Non essentiality of concurrent cell divisions for degree of polarization of leaf growth. I. Studies with radiation-induced mitotic inhibition. Am. J. Bot. 49, 583-589.
- Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., Kasuga, M., Nishimoto, I. et Avruch, J. (1997) Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. J. Biol. Chem. 272, 26457-26463.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.-P., Kozlowski, M. T., Belham, C. et Avruch, J. (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF4E BP1 through a common effector mechanism. J. Biol. Chem. 273, 14484-14494.
- Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F., et Schreiber, S. L. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14866-14870.
- Harrar, Y., Bellini, C. et Faure, J.-D. (2001) FKBP: at the crossroad of folding and transduction. Trends Plant Sci. 6, 426-431.
- Harris, D. M., Myrick, T. L. et Rundle, S. J. (1999) The *Arabidopsis* homolog of yeast TAP42 and mammalian  $\alpha 4$  binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. Plant Physiol. 121, 606-617.

- Harris, E. H. (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. San Diego: Academic Press Inc.
- Hashemolhosseini, S., Nagamine, Y., Morley, S. J., Desrivieres, S., Mercep, L., et Ferrari, S. (1998) Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J. Biol. Chem.* 273, 14424–14429.
- Heitman, J., Movva, N. R., et Hall, M. N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Helliwell, S., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. et Hall, M. N. (1994) TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5, 105-118.
- Helliwell, S. B., Howald, I., Barbet, N. et Hall, M. N. (1998) TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 99-112.
- Hemerly, A. S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G. et Inzé, D. (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5, 1711-1723.
- Hemerly, A., de Almeida Engler, J., Brgounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D. et Ferreira, P. (1995) Dominant negative mutants of the *cdc2* kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* 14, 3925-3936.
- Hentges, K. E., Thompson, K. et Peterson, A. S. (1999) The *flat-top* gene is required for the expansion and régionalisation of the telencephalic primordium. *Development* 126, 1601-1609.
- Hentges, K. E., Sirry, B., Gingras, A-C, Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D. et Peterson, A. S. (2001) FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13796-13801.
- Hepler, P. K., Vidali, L. et Cheung, A. Y. (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 159-187.
- Hidalgo, M. et Rowinsky, E. K. (2000) The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6680-6686.
- Iiboshi, Y., Papst, P.J., Kawasome, H., Hosoi, H., Abraham, R. T., Houghton, P. J. et Terada, N. (1999a) Amino acid-dependent control of p70s6k. Involvement of tRNA aminoacylation in the regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 1092-1099.
- Iiboshi, Y., Papst, P.J., Hunger, S. P. et Terada, N. (1999b) L-asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 260, 534-539.
- Inui, S., Sanjo, H., Maeda, K., Yamamoto, H., Miyamoto, E. et Sakaguchi, N. (1998) Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Blood* 92, 539–546.
- Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J. et Yonezawa, K. (1999) Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase  $\alpha$  *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 274, 34493-34498.
- Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K. T., Schmelzle, T. et Hall, M. N. (2001) TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* 8, 1017-1026.
- James, P., Halladay, J. et Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.

- Jayaraman, T. et Marks, A. R. (1993) Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line. *J. Biol. Chem.* 268, 25385-25388.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. et Bevan, M. W. (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.
- Jiang, Y. et Broach, J. R. (1999) Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* 18, 2782-2792.
- Jefferies, H. B., Reinhard, C., Kozma, S. C. et Thomas, G. (1994) Rapamycin selectively represses translation of the « polyrimidine tract » mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4441-4445.
- Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., et Thomas, G. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70 s6k. *EMBO J.* 16, 3693-3704.
- Johnson, S. P. et Warner, J. R. (1987) Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* equivalent of ribosomal protein S6 has no detectable effect on growth. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1338-1345.
- Johnston, G. C., Tringle, J. R. et Hartwell, L. H. (1977) Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* 105, 79-98.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. et Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated Induction of Autophagy Via an Apg1 Protein Kinase Complex. *J Cell Biol.* 150, 1507-1513.
- Kaplan, D. R. et Hagemann, W. (1991) The relationship of cell and organism in vascular plants. *Bioscience* 41, 693-703.
- Kawai, M., Nakashima, A, Ueno, M., Ushimaru, T., Aiba, K., Doi, H. et Uritani, M. (2001) Fission yeast Tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr. Genet.* 39, 166-174.
- Kawamata, S., Sakaida, H., Hori, T., Maeda, M. et Uchiyama, T. (1998) The upregulation of p27Kip1 by rapamycin results in G1 arrest in exponentially growing T-cell lines. *Blood* 91, 561-569.
- Kende, H. et Zeevaart, J. A. D. (1997) The five « classical » plant hormones. *Plant Cell* 9, 1197-1210.
- Kim, J. E. et Chen, J. (2000) Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14340-14345.
- Kimball, S. R., Shantz, L. M., Horetsky, R. L. et Jefferson, L. S. (1999) Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 274, 11647-11652.
- Kimball, S.R. et Jefferson, L.S. (2000) Regulation of translation initiation in mammalian cells by amino acids. *In* Translational control of gene expression (ed. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, et M. B. Mathews), pp. 561-579. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T. Noda, T. et Ohsumi, Y. (1999) Formation of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435-446.

- Klionsky, D. J. et Emr, S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290,1717-1721.
- Kohalmi, S. E., Nowak, J., et Crosby, W. L. (1997) The yeast two-hybrid system. In *Differentially expressed genes in plants: a bench manual*. (ed. E. Hansen and G. Harper), pp. 63-82. Taylor & Francis, London.
- Komeili, A., Wedaman, K. P., O'Shea, E. K. et Powers, T. (2000) Mechanism of metabolic control: target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell Biol.* 151, 863-878.
- Koncz, C. et Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204. 383-396.
- Kondorosi, E., Roudier, F. et Gendreau, E. (2000) Plant cell-size: growing by ploidy ? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 488-492.
- Koromilas, A. E., Lazaris-Karatzas, A., et Sonenberg, N. (1992) mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' noncoding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* 11, 4153–4158.
- Kumar, V., Pandey, P., Sabatini, D., Kumar, M., Majumder, P. K., Bharti, A., Carmichael, G., Kufe, D. et Kharbanda, S. (2000) Functional interaction between RAFT1/FRAP/mTOR and protein kinase C $\delta$  in the regulation of cap-dependent initiation of translation. *EMBO J.* 19, 1087-1097.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R. et Hall, M. N. (1993) Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585-596.
- Kunz, J., Schneider, U., Howald, I., Schmidt, A. et Hall, M. N. (2000) HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *J. Biol. Chem.* 275, 37011-37020.
- Kuruvilla, F. G. et Schreiber, S. L. (1999) The PIK-related kinases intercept conventional signaling pathways. *Chem. Biol.* 6, R129-136.
- Lambertsson, A. (1998) The *Minute* genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv. Genet.* 38, 69-134.
- Leyser, O. et Fitter, A. (1998) Roots are branching out in patches. *Trends Plant Sci.* 3, 203-204.
- Liang, J., Choi, J. et Clardy, J. (1999) Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2Å resolution. *Acta Cryst.* D55, 736-744.
- Luan, S., Kudla, J., Gruissen, W. et Schreiber, S. L. (1996) Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6964-6969.
- Luo, Y., Marx, S. O., Kiyokawa, H., Koff, A., Massagué, J. et Marks, A. R. (1996) Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6744-6751.
- Lynch, C. J., Fox, H. L., Vary, T. C., Jefferson, L. S. et Kimball, S. R. (2000) Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. *J. Cell. Biochem.* 77, 234-251.
- Lynch, C. J., Patson, B. J., Goodman, S. A., Trapolsi, D. et Kimball, S. R. (2001) Zinc stimulates the activity of the insulin- and nutrient-regulated protein kinase mTOR. *Am. J. Physiol.* 281, E25-E34.
- Lomovskaya, N., Fonstein, L., Ruan, X., Stassi, D., Katz, L. et Hutchinson, C. R. (1997) Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC29253. *Microbiology* 143, 975-883.

- Mahajan, P. B. (1994) Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin. *Int. J. Immunopharmacol.* 16, 711–721.
- Malamy, J. E. et Benfey, P. N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33–44.
- Mansfield, S. G. et Briarty, L. G. (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69, 461–476.
- Mansfield, S. G., Briarty, L. G. et Erni, S. (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Can. J. Bot.* 69, 447–460.
- Marx, S. O., et Marks, A. R. (1999) Cell cycle progression and proliferation despite 4BP-1 dephosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6041–6047.
- Matsuoka, K., Bassham, D., Raikhel, N. et Nakamura, K. (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries on tobacco cells. *J. Cell Biol.* 130, 1307–1318.
- Medford, J. I., Behringer, F. J., Callos, J. D. et Feldmann (1992) Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant Cell* 4, 631–643.
- Meijer, M. et Murray, M. A. H. (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 44–49.
- Meyuhas, O. et Hornstein, E. (2000) Translational control of TOP mRNAs. *In* Translational control of gene expression (ed. N. Sonenberg, J. W. B. Hershey et M. B. Mathews), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 671–694.
- Minet, M., Dufour, M. E. et Lacroute, F. (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2, 417–422.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M. et Inzé, I. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants – the nexus. *Plant Cell* 11, 509–521.
- Mizukami, Y. et Fischer, R. L. (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell number during organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 942–947.
- Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., et Thomas, G. (1999) Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285, 2126–2129.
- Morice, W. G., Brunn, G. J., Wiederrecht, G., Siekierka, J. J. et Abraham, R. T. (1993) Rapamycin induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 3734–3738.
- Munnik, T., Irvine, R. F. et Musgrave, A. (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochem. Biophys. Acta* 1389, 222–272.
- Murashige, T. et Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Murata, K., Wu, J. et Brautigan, D. L. (1997) B cell receptor-associated protein  $\alpha 4$  displays rapamycin-sensitive binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10624–10629.
- Nanahoshi, M., Nishiuma, T., Tsujishita, Y., Hara, K., Inui, S., Sakaguchi, N., et Yonezawa, K. (1998) Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by  $\alpha 4$  protein and its yeast homolog Tap42. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 520–526.
- Navé, B. T., Ouwers, M., Withers, D. J., Alessi, D. R., and Shepherd, P. R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* 344, 427–431.



- Neuhaus, P., Klupp, J. et Lengrehr, J. M. (2001) mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transplantation* 7, 473-484.
- Nicol, F. et Höfte, H. (1998) Plan cell expansion: scaling the wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 12-17.
- Nishiuma, T., Hara, K., Tsujishita, Y., Kaneko, K., Shii, K. et Yonezawa, K. (1998) Characterization of the phosphoproteins and protein kinase activity in mTOR immunoprecipitates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 440-444.
- Noda, T. et Ohsumi, Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963-3966.
- Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W. M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M. H., Massague, J., Crabtree, G. R., et Roberts, J. M. (1994) Interleukin-2-mediated elimination of the p27 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570-573.
- Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G. et Hafen, E. (2000) Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.* 14, 2689-2694.
- Owen, H. A. et Makaroff, C. A. (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185, 7-21.
- Page, D. R. et Grossniklaus, U. (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 124-136.
- Parekh, D., Ziegler, W, Yonezawa, K., Hara, K. et Parker, P. J. (1999) Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKC $\delta$  and nPKC $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* 274, 34758-34764.
- Parker, E. M., Monopoli, A., Ongini, E., Lozza, G., Babij, C. M. (2000) Rapamycin, but not FK506 and GPI-1046, increases neurite outgrowth in PC12 cells by inhibiting cell cycle progression. *Neuropharmacology* 39, 1913-1919.
- Parott, L. A. et Templeton, D. J. (1999) Osmotic stress inhibits p79/85 S6 kinase through activation of a protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274, 24731-24736.
- Patti, M.-E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E. J. et Kahn, C. R. (1998) Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J. Clin. Invest.* 101, 1519-1529.
- Peterson, R. T., Desai, B. N., Hardwick, J. S., et Schreiber, S. L. (1999) Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4438-4442.
- Peterson, R. T., Beal, P. A., Comb, M. J., et Schreiber, S. L. (2000) FKBP12-Rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J. Biol. Chem.* 275, 7416-7423.
- Polymenis, M., et Schmidt, E. V. (1997) Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev.* 11, 2522-2531.
- Powers, T. et Walter, P. (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 987-1000.
- Prestridge, D. S. (1995) predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J. Mol. Biol.* 249, 923-932.
- Price, D. J., Grove, J. R., Calvo, V., Avruch, J., and Bierer, B. E. (1992) Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 257, 973-977.

- Prober, D. A. et Edgar, B. A. (2001) Growth regulation by oncogenes — new insights from model organisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 19–26.
- Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, P., Hafen, E. et Thomas, G. (2002) dS6K regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat. Cell Biol.* Sous presse.
- Raught, B., Gingras, A.-C., Gygi, S.P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R. et Sonenberg, N. (2000) Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J.* 19, 434–444.
- Redpath, N. T., Foulstone, E. et Proud, C. G. (1996) Regulation of translation elongation factor-2 by insulin via a rapamycin-sensitive signalling pathway. *EMBO J.* 15, 2291–2297.
- Richards, D. E., King, K. E., Ait-ali, T. et Harberd, N. P. (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 52, 67–88.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqmad, A. et Murray, J. A. H. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283, 1541–1544.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. et Murray, J. A. H. (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4513–4521.
- Rose, A. B. et Last, R. L. (1997) Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene PAT1. *Plant J.* 11, 455–464.
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., et Snyder, S. H. (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35–43.
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., et Abraham, R. T. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270, 815–822.
- Sarkaria, J. N., Tibbetts, R. S., Busby, E. C., Kennedy, A. P., Hill, D. E. et Abraham, R. T. (1998) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res.* 58, 4375–4382.
- Sarrobere, C., Thibaud, M.-C., Contard-David, P., Gineste, S., Bechtold, N., Robaglia, C., et Nussaume, L. (2000) Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. *Plant J.* 24, 357–368.
- Schmelzle, T. et Hall, M. N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 253–262.
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J. et Hall, M. N. (1998) The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* 17, 6924–6931.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., et Hall, M. N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531–542.
- Schmidt, A., Kunz, J. et Hall, M. N. (1996) TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13780–13785.
- Schmidt, E. V. (1999) The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 18, 2988–2996.
- Scott, P. H., Brunn, G. J., Kohn, A. D., Roth, R. A., et Lawrence, J. C. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7772–7777.

- Shah, O. J., Anthony, J. C., Kimball, S. R. et Jefferson, L. S. (2000) 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E715-E729.
- Sherr, C. J. et Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., et Kozma, S. C. (1998) Disruption of the p70<sup>s6k</sup>/p85<sup>s6k</sup> gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17, 6649–6659.
- Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C. et Izumo, S. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 19, 2537-2548.
- Stals, H. et Inzé, D. (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6, 359-364.
- Stan, R, Mc Laughlin, M. M., Cafferkey, R., Johnson, R. K., Rosenberg, M. et Livi, G. P. (1994) Interaction between FKPB12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J. Biol. Chem.* 269, 32027-32030.
- Staunton, J. et Wilkinson, B. (1997) Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chem. Rev.* 97, 2611-2629.
- Stewart, M. J., Berry, C. O., Zilberman, F., Thomas, G., et Kozma, S. C. (1996) The *Drosophila* p70s6k homolog exhibits conserved regulatory elements and rapamycin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10791–10796.
- Takahashi, T., Hara, K., Inoue, H., Kawa, Y., Tokunaga, C., Hidayat, S., Yoshino, K. I., Kuroda, Y. et Yonezawa, K. (2000) Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function *in vivo* and *in vitro*. *Genes Cells* 5, 765-775.
- Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J. et Meyuhas, O. (2001) Amino acid–induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8671-8683.
- Thomas, G. (2000) An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* 2, E71-E72.
- Turck, F., Kozma, S. C., Thomas, G. et Nagy, F. (1998) A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2038-2044.
- Twell, D., Ki Park, S. et Lalanne, E. (1998) Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends Plant Sci.* 3, 305-310.
- Überlacker, B. et Werr, W. (1996) Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Mol. Breeding* 2, 293-295.
- Valenzuela, L., Aranda, C. et Gonzalez, A. (2001) TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* 183, 2331-2334.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. et Rocha-Sosa, M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220, 245-250.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. et Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Acids Res.* 17, 2362.
- Vézina, C., Kudelski, A. et Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal

- antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiotics* 28, 721-726.
- Vilella-Bach, M., Nuzzi, P., Fang, Y. et Chen, J. (1999) The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *J. Biol. Chem.* 274, 4266-4272.
- Volaveric, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Ziberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S. C. et Thomas, G. (2000) Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 288, 20-22.
- Von Manteuffel, S. R., Gingras, A.-C., Ming, X.F., Sonenberg, N. et Thomas, G. (1996) 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4076-4080.
- Von Manteuffel, S. R., Dennis, P. B., Pullen, N., Gingras, A.-C., Sonenberg, N. et Thomas, G. (1997) The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70S6k. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5426-5436.
- Vucich, V. A. et Gasser, C. S. (1996) Novel structure of a high molecular weight FK506 binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 510-517.
- Wang, L. et Wessler, S. R. (1998) Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize *R* gene. *Plant Cell* 10, 1733-1745.
- Wang, X., Campbell, L. E., Miller, C. M. et Proud, C. G. (1998) Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem. J.* 334, 261-267.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R. et Proud, C. G. (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20, 4370-4379.
- Warner, J. R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24, 437-440.
- Weisman, R. et Choder, M. (2001) The fission yeast TOR homolog, tor1+, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *J. Biol. Chem.* 276, 7027-32.
- Weisman, R., Choder, M. et Koltin, Y. (1997) Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation. *J. Bacteriol.* 19, 6325-6334.
- Weisman, R., Finkelstein, S. et Choder, M. (2001) Rapamycin blocks sexual development in fission yeast through inhibition of the cellular function of an FKBP12 homolog. *J Biol. Chem.* 276, 24736-24742.
- Weng, Q. P., Kozlowski, M., Belham, C., Zhang, A., Comb, M. J., et Avruch, J. (1998) Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J. Biol. Chem.* 273, 16621-16629.
- West, M. J., Stoneley, M., et Willis, A. E. (1998) Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene* 17, 769-780.
- Westphal, R. A., Coffee Jr., R. L., Marotta, A., Pelech, S. L. et Wadzinski, B. E. (1999) Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A. *J. Biol. Chem.* 274, 687-692.
- White, R. J. (1997). Regulation of RNA polymerases I and III by the retinoblastoma protein: a mechanism for growth control ? *Trends Biochem. Sci.* 22, 77-80.

- Whittington, A. T., Vugrek, O., Wei, K. J., Hasenbein, N. G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M. C. et Wasteney, G. O. (2001) MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411, 610-613.
- Xu, Q., Liang, S., Kudla, J. and Luan, S. (1998) Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin. *Plant J.* 15, 511-519.
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J. et Reeves, S. A. (2000) Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr. Biol.* 10, 47-50.
- Yu, S.-M. (1999) Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol.* 121, 687-693.
- Zambryski, P. et Crawford, K. (2000) Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 393-421.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J. et Schultz, M. C. (1998) Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4463-4470.
- Zhang, H., et Forde, B. G. (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279, 407-409.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P. W. et Forde, B. G. (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6529-6534.
- Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C. et Neufeld, T. P. (2000) Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* 14, 2712-2724.
- Zhao, L. et Sack, F. D. (1999) Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *Am. J. Bot.* 86, 929-939.
- Zheng, X.-F. et Schreiber, S. L. (1997) Target of rapamycin proteins and their kinase activities are required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3070-3075.
- Zheng, X.-F., Florentino, D., Chen, J., Crabtree, G. R., and Schreiber, S. L. (1995) TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 82, 121-130.
- Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Le Good, J. A., Whelan, R. D. H., Kelly, J. J., Frech, M., Hemmings, B. A. et Parker, P. J. (1999) Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex. *Curr. Biol.* 9, 522-529.

## Abbreviations

(les termes anglo-saxons sont indiqués entre parenthèses)

4E-BP (eIF4E Binding Protein) : protéine fixant eIF4E.

AD (Activator Domain) : domaine d'activation de la transcription

ADN : acide désoxyribonucléique.

ARN : acide ribonucléique.

ARNm : ARN messenger.

ARNr : ARN ribosomal.

ARNt : ARN de transfert.

At : *Arabidopsis thaliana*.

ATP : adenosine triphosphate.

BAC (Bacterial Artificial chromosome) : chromosome bactérien artificiel.

BD (Binding Domain) : domaine de fixation à l'ADN

CDK (cyclin-dependent kinase) : kinase dépendante d'une cycline.

d (drosophila) : drosophile.

EDTA : acide éthylène-diaminetetraacétique

eIF (eucaryotic Initiation Factor) : facteur eucaryotique d'initiation de la traduction.

EST (Expressed Sequence Tag) : séquence exprimée

FKBP : (FK506-Binding Protein) : protéine fixant FK506.

FRBd (FKBP12 and rapamycin Binding domain) : domaine de fixation à FKBP12 et la rapamycine.

répétition HEAT : répétition trouvée dans l'Huntingtin, le facteur d'élongation 3, la sous-unité A de la protéine phosphatase PP2A et TOR1.

GAL : activateur de transcription des gènes requis pour l'utilisation du galactose par *S. cerevisiae*

GUS,  $\beta$ -glucuronidase.

IGF (Insulin-like Growth Factors) : facteurs de croissance de type insuline.

Kb : kilo paires de bases

Kda : kiloDalton

m (mammalian) : mammifère.

PCR (Polymerase Chain Reaction) : amplification en chaîne par polymérase

Pb : paire de base

PDK1 (3-Phosphatidylinositol dependent kinase) : kinase dépendante du PI(3 :4 :5)P3.

PI : Phosphatidylinositol.

PI(3)P : PI 3-phosphate.

PI(3 :4)P2 : PI 3 : 4-bisphosphate.

PI(3 :4 :5)P3 : PI 3 : 4 : 5-trisphosphate.

PI3K phosphatidylinositol 3-kinase.

PKB : Protéine Kinase B.

PKC : Protéine Kinase C.

PP2A : protéine phosphatase de type 2A.

PTEN (phosphatase and tensin homologue).

5'RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) : amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ADNc

Rapa : rapamycine.

S6K : S6 kinase.

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*.

SDS : sodium dodecyl sulfate

Sp : *Schizosaccharomyces pombe*.

RACE (rapid amplification of cDNA ends) : amplification rapide des extrémités d'un ADNc

RT (Reverse Transcription) : transcription inverse

TAP42 (PP2A Associated protein) : protéine associée à PP2A

TOP (tract of oligopyrimidine) : bloque d' oligopyrimidine.

TOR (Target Of Rapamycin) : protéine cible de la rapamycine.

UAS (Upstream Activated Sequence) : séquence activatrice en aval

uORF (upstream open reading frame) : cadre ouvert de lecture en amont.

Aminoacide	code à 3 lettres	code à 1 lettre	codons
Alanine	Ala	A	GCC, GCU, GCG, GCA
Arginine	Arg	R	CGC, CGG, CGU, CGA, AGA, AGG
Asparagine	Asn	N	AAU, AAC
Aspartic acid	Asp	D	GAU, GAC
Cysteine	Cys	C	UGU, UGC
Glutamic acid	Glu	E	GAA, GAG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Glycine	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidine	His	H	CAU, CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Leucine	Leu	L	UUA, UUG, CUA, CUG, CUU, CUC
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Methionine	Met	M	AUG
Phenylalanine	Phe	F	UUC, UUU
Proline	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Serine	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonine	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU, UAC
Tryptophan	Trp	W	UGG
Valine	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
"Stop"	—	—	UAA, UAG, UGA

## Nomenclature des aminoacides, et code génétique

## RESUME

Les protéines kinase TOR (Target Of Rapamycin) ont été identifiées, chez les levures, les mammifères et la drosophile, comme des régulateurs majeurs de la croissance cellulaire. Ainsi, la progression des phases G1 à S du cycle cellulaire est bloquée par la rapamycine, un antibiotique capable d'inhiber spécifiquement TOR en formant un complexe ternaire avec le domaine FRB (FKBP-rapamycin binding domain) of TOR et une autre protéine appelée FKBP12 (FK506 and rapamycin Binding Protein). Ce travail présente l'étude moléculaire et génétique de l'homologue d'*Arabidopsis thaliana* des gènes *TOR* de levures et d'animaux.

Nous avons clone l'ADNc de l'unique gène *TOR* d'*Arabidopsis* (*AtTOR*) qui contient 55 introns et code une protéine de 300 kDa qui présente un important taux d'identité avec ses homologues d'animaux et de levure. Cependant, la croissance végétative d'*Arabidopsis*, ainsi que celle d'autres plantes testées, sont insensibles à la rapamycine. Néanmoins, des expériences de double hybride ont montré que le domaine FRB de *AtTOR* est capable de fixer FKBP12 de levure d'une manière dépendante de la rapamycine.

Deux mutants (*tor-1* et *tor-2*) ont été identifiés dans la collection de mutants d'insertion d'un ADN-T de l'INRA de Versailles. Chez les deux mutants, l'ADN-T s'est inséré en amont des domaines FRB et kinase. Les deux mutants ne se complémentent pas et ont un phénotype embryon létal caractérisé par le fait qu'un quart des graines d'une silique hétérozygotes présentent un arrêt prématuré du développement de l'albumen et de l'embryon, ce dernier étant bloqué au stade globulaire. Nous avons utilisé une fusion traductionnelle entre *AtTOR* et le gène rapporteur *GUS* présente dans le mutant *tor-1* pour montrer que l'expression de *AtTOR* est restreinte à l'embryon, l'albumen, et tous les méristèmes primaires. Cela est différent de TOR de mammifères et TOR de drosophile qui sont exprimés dans tous les tissus. Ces résultats nous ont amené à discuter le rôle de *AtTOR* dans la croissance cellulaire et la prolifération.

De plus, des expériences ayant pour but de rendre *Arabidopsis* résistante à la rapamycine ont été initiées, et des constructions ont été réalisées pour sur-exprimer *AtTOR* avec le système GAL4.



## ABSTRACT

TOR (target of rapamycin) protein kinases were identified in yeast, mammals and *Drosophila* as central controllers of cell growth. Thus, G1 to S phases progression through the cell cycle is blocked by rapamycin, a drug which specifically inhibits TOR activity by forming a ternary complex with the peptidyl-prolyl isomerase FKBP12 (FK506 and rapamycin binding protein), and the FKBP-rapamycin binding domain (FRB) of TOR proteins. This work presents the study, the *Arabidopsis* homologue of yeast and animals TOR genes.

By using RT-PCR and 5'-RACE, we cloned the cDNA of the single *Arabidopsis* TOR (*AtTOR*) gene which contains 55 introns and encodes a protein of 300 kDA showing a high level of identity with its homologues from yeast and animals. However, the vegetative growth of *Arabidopsis* and other plants tested is insensitive to rapamycin. Nonetheless, we have shown, using a two hybrid system, that the AtTOR FRB domain is able to bind yeast FKBP12 in the presence of rapamycin.

The function of *AtTOR* has been studied by reverse genetics. Two mutants, *tor-1* and *tor-2*, have been identified in the INRA T-DNA insertion library (Versailles, France). In both mutants, the T-DNA is inserted upstream of the FRB and kinase domains of AtTOR. The two mutants do not complement each other and have an embryo-lethal phenotype in which one quarter of the seeds from a selfed pollinization of a heterozygotic parent die because of arrested development of the embryo and endosperm. We used a translational fusion of *AtTOR* with the *GUS* reporter gene in the *tor-1* mutant to show that *AtTOR* expression is restricted to the developing endosperm and embryo, and all the primary meristems of the plant. This is different to mammalian and *Drosophila* TORs, which are expressed in all tissues. These results allow us to discuss the role of *AtTOR* in cell growth and proliferation

Furthermore, experiments attempting to render *Arabidopsis* sensitive to rapamycin, by transformation with yeast FKBP12, were undertaken and constructs for *AtTOR* overexpression using the GAL4 system were made.